

**BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN  
AN MUTIERTEN FETTSÄURE-SYNTHESE-KOMPLEXEN  
DER HEFE**

**Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades**

**vorgelegt von  
Knut Werkmeister  
aus Lindow**



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546212\\_0068](https://archive.org/details/IA41546212_0068)

BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN AN MUTIERTEN FETTSÄURE-  
SYNTHETASE —KOMPLEXEN DER HEFE

Den Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von  
Knut Werkmeister  
aus Lindow

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-  
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.1980

Vorsitzender der Promotionskommission:

Professor Dr. H. Wegener

Erstberichterstatter: Professor Dr. E. Schweizer

Zweitberichterstatter: Professor Dr. H. Kersten

Die vorliegende Arbeit wurde von November 1976 bis März 1980 auf Anregung und unter der Leitung von Herrn Professor Dr. E. Schweizer am Institut für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg angefertigt.

Herrn Professor Dr. E. Schweizer danke ich herzlich für das Interesse, das er mir und meiner Arbeit jederzeit zuteil werden ließ.

Für die zuverlässige, gelegentliche Mitarbeit danke ich Frl. A. Petersen und Frl. P. Viel. Ebenso danke ich Herrn H.J. Höltke für seine sorgfältige und intelligente Mitarbeit im Rahmen des Fortgeschrittenen-Praktikums.

Ferner möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biochemie der Universität Erlangen-Nürnberg für ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Fräulein Dr. L. Roberts und Herrn Dr. W. Demmer gilt mein Dank für die anregende Zusammenarbeit.

Für die Aufnahme der Fluoreszenzspektren einiger Fettsäuresynthetase-Präparationen bin ich Herrn Prof. Dr. P. Hemmerich, Fachbereich Biologie der Universität Konstanz, zu großem Dank verpflichtet.

## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                       | <u>Seite</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Inhaltsverzeichnis                                                                                                                    | V            |
| Verzeichnis der Tabellen                                                                                                              | IX           |
| Verzeichnis der Figuren                                                                                                               | XI           |
| Abkürzungen                                                                                                                           | XIV          |
| <br>                                                                                                                                  |              |
| I. <u>EINLEITUNG</u>                                                                                                                  | 1            |
| <br>                                                                                                                                  |              |
| II. <u>MATERIAL UND METHODEN</u>                                                                                                      | 10           |
| 1. Geräte                                                                                                                             | 10           |
| 2. Enzyme und Chemikalien                                                                                                             | 11           |
| 3. Hefestämme                                                                                                                         | 15           |
| 4. Medien                                                                                                                             | 15           |
| 5. Komplementationsanalysen                                                                                                           | 18           |
| 6. Feststellung der Wachstoffsstoff-Be-<br>dürfnisse von <u>fas</u> -Mutanten                                                         | 19           |
| 7. Allgemeine analytische Methoden                                                                                                    | 19           |
| 8. Immunologische Methoden                                                                                                            | 20           |
| 9. Nachweis des <sup>14</sup> C-Pantothen säure-<br>Einbaus in die FSS von <u>fas</u> -Mutanten<br>durch TCA-Fällung des Rohextraktes | 22           |
| 10. Aufschluß von Hefezellen                                                                                                          | 23           |
| 11. Lagerung von Hefezellen vor der<br>Enzymisolierung                                                                                | 25           |
| 12. Hefezucht und Revertantentest                                                                                                     | 25           |
| 13. Bestimmung der Gesamtreaktion und<br>der Teilaktivitäten der Fettsäure-<br>synthetase                                             | 27           |
| 14. Isolierung der Fettsäuresynthetase                                                                                                | 30           |

|                                                                                                                 | <u>Seite</u> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 15. Beladung von Fettsäuresynthetase mit $^{14}\text{C}$ -Acetyl- und $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-Resten | 32           |
| 16. Dissoziation und präparative Trennung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$           | 33           |
| 17. Reassoziaton der FSS-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$                                                    | 34           |
| 18. Bildung von Hybridkomplexen zur <u>in vitro</u> -Komplementation mutierter Fettsäuresynthetasen             | 35           |
| 19. Hefezellrohextrakt-Konzentrat                                                                               | 35           |

### III. ERGEBNISSE

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A. <u>Nachweis und biochemische Charakterisierung einiger neuartiger genetischer Defekte des Fettsäure-Synthetase-Systems der Hefe</u>          | 36 |
| 1. Nachweis von Acetyltransferase-Mutanten sowie biochemische Charakterisierung aller zur Verfügung stehenden Arten von <u>fas1</u> -Mutationen | 36 |
| 2. $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Beladung des Acetyltransferase-defekten Fettsäuresynthetase-Komplexes der Mutante <u>fas1-1320</u>                   | 49 |
| 3. Ungewöhnliches Flavin-Spektrum der Mutante <u>fas1-1923</u>                                                                                  | 52 |
| 4. Nachweis und Charakterisierung von Pantethein-freien fas-Mutanten                                                                            | 60 |
| a) Immunpräzipitation von $^{14}\text{C}$ -markierter Fettsäuresynthetase aus <u>fas</u> -Mutanten                                              | 60 |

|                                                                                                                                                                                     | <u>Seite</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| b) Nachweis der Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplexe durch Untersuchung des gereinigten Enzyms                                                                            | 74           |
| 5. Biochemische Charakterisierung gereinigter Mutanten-Fettsäuresynthetasen aus verschiedenen <u>fas2</u> -Komplementationsgruppen                                                  | 83           |
| 6. $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Beladung des Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplexes der Mutante <u>fas2-2562</u> sowie Perameisensäureoxidation des gebildeten Acetyl-Enzyms    | 91           |
| <br>B. <u>Reversible Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes sowie in vitro-Komplementation mit gereinigten Mutantenenzymen</u>                                              | <br>93       |
| 1. Dissoziation von $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure und $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-markierter Fettsäuresynthase                                                             | 93           |
| 2. Isolierte Fettsäuresynthetase $\beta$ -Untereinheiten besitzen Enoyl-Reduktase - Aktivität                                                                                       | 98           |
| 3. Immonologische Untersuchung der isolierten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$                                                                               | 102          |
| 4. Negative Komplementation zwischen heterofunktionell defekten <u>fas1</u> -Mutanten <u>in vivo</u>                                                                                | 104          |
| 5. Dissoziation und Reassoziatio n von Fettsäuresynthetase-Komplexen aus verschiedenen heterofunktionell defekten <u>fas</u> -Mutanten, sowie aus verschiedenen Wildtyp-Hefestämmen | 110          |
| 6. <u>In vitro</u> Komplementation gereinigter Fettsäuresynthetase-Mutantenenzyme                                                                                                   | 119          |

|                                                                                                                                                          | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| a) Intergene Komplementation                                                                                                                             | 122          |
| b) Intragene Komplementation zwischen<br>iso- und heterofunktionell defekten<br><u>fas2</u> -Mutationen                                                  | 125          |
| c) Herstellung von Pantethein-freien<br>Fettsäuresynthetase-Apoenzymen durch<br><u>in vitro</u> Rekombination gereinigter<br><u>fas2</u> -Mutantenenzyme | 130          |
| 7. Nachweis von CoA: Apo-ACP O-Phospho-<br>pantetheintransferase-Aktivität im<br>Zellextrakt von Hefe                                                    | 137          |
| C. <u>Methodische Verbesserungen zur Fettsäure-<br/>synthetase-Isolierung aus Hefe</u>                                                                   | 147          |
| 1. Zellaufschluß durch Einfrieren in<br>flüssigem Stickstoff                                                                                             | 147          |
| 2. Polymin P-Fraktionierung                                                                                                                              | 149          |
| 3. Verwendung eines Vertikalrotors zur<br>Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifu-<br>gation                                                                 | 151          |
| 4. Abhängigkeit des Fettsäuresynthetase-<br>Gehaltes von der Hefesorte und den An-<br>zuchtbedingungen der Hefe                                          | 154          |
| IV. <u>DISKUSSION</u>                                                                                                                                    | 158          |
| V. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>                                                                                                                                | 162          |
| VI. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>                                                                                                                          | 165          |

VERZEICHNIS DER TABELLEN

|                                                                                                                                     | <u>Seite</u> |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Tab. 1: Teilenzymaktivitäten von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen aus Wildtyp und <u>fas1</u> -Mutantenzellen          | 42           |
| Tab. 2: Bildung und oxidative Spaltung von $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym bei Wildtyp und <u>fas1-1320</u> Fettsäuresynthetase        | 51           |
| Tab. 3: $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure-Einbau in <u>fas1</u> -Mutanten                                                             | 65           |
| Tab. 4: $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure-Einbau in <u>fas2</u> -Mutanten                                                             | 67           |
| Tab. 5: $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure-Einbau in den Fettsäuresynthetase-Komplex verschiedener ausgewählter <u>fas2</u> -Mutanten. | 82           |
| Tab. 6: Teilaktivitäten von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen aus Wildtyp und <u>fas2</u> -Mutantenzellen               | 85           |
| Tab. 7: Gesamtaktivität der gereinigten Fettsäuresynthetase aus <u>fas2-1663</u>                                                    | 89           |
| Tab. 8: Perameisensäure Oxidation von $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Fettsäuresynthetase aus <u>fas2-2562</u>                              | 92           |
| Tab. 9: Hemmung der Enoylreduktase-Aktivität durch Jodessigsäure                                                                    | 100          |
| Tab.10: <u>In vivo</u> "Negative" Komplementation zwischen heterofunktionell defekten <u>fas1</u> -Mutanten                         | 107          |
| Tab.11: Enzymaktivitäten nativer und reassoziierter Fettsäuresynthetase aus Bierhefe und dem Wildstamm <u>SC 167</u>                | 111          |
| Tab.12: Einfluß verschiedener Flavine auf die Reassoziaton und Reaktivierung von DMMA-gespaltener Fettsäuresynthetase aus Bierhefe  | 117          |

|                                                                                                                                                                          | <u>Seite</u> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Tab. 13: <u>In vitro</u> Komplementation zwischen gereinigten <u>fas1</u> und <u>fas2</u> Mutanten-Enzymen                                                               | 123          |
| Tab. 14: Intragene <u>in vitro</u> Komplementation zwischen 2 heterofunktionell defekten <u>fas2</u> Mutanten-Enzymen                                                    | 126          |
| Tab. 15: Intragene <u>in vitro</u> Komplementation zwischen zwei isofunktionellen defekten <u>fas2</u> Mutanten-Enzymen                                                  | 127          |
| Tab. 16: <u>In vivo</u> und <u>in vitro</u> Komplementation zwischen zwei Pantethein-freien Mutanten-Enzymen aus zwei verschiedenen <u>fas2</u> -Komplementationsgruppen | 132          |
| Tab. 17: <u>In vivo</u> und <u>in vitro</u> Komplementation zwischen Pantethein-freien Mutanten-Enzymen aus derselben <u>fas2</u> -Komplementationsgruppe (VII)          | 133          |
| Tab. 18: <u>In vitro</u> Komplementation zwischen Pantethein-freien Mutanten-Enzymen aus derselben Komplementationsgruppe (VII)                                          | 134          |
| Tab. 19: Spezifische Enzymaktivitäten in verschiedenen bei der Bildung hybrider Apoenzyme auftretenden Pantethein-freien Assoziationsprodukten                           | 145          |
| Tab. 20: Reinigungsschema des Fettsäuresynthetase-Komplexes                                                                                                              | 155          |
| Tab. 21: Reinigung von Fettsäuresynthetase aus verschiedenen Hefe-Sorten: Ausbeuten und spezifische Enzymaktivitäten                                                     | 157          |
| Tab. 22: In der vorliegenden Arbeit benutzte <u>Saccharomyces cerevisiae</u> Stämme                                                                                      | 15           |

VERZEICHNIS DER FIGUREN

|                                                                                                                                                                                        | <u>Seite</u> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Fig. 1: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes, welcher am Fettsäuresynthetase-Komplex zur Verlängerung einer Fettsäurekette um 2 C-Atome führt                                | 4            |
| Fig. 2: <u>fas1</u> -Komplementationskarte                                                                                                                                             | 5            |
| Fig. 3: <u>fas2</u> -Komplementationskarte                                                                                                                                             | 7            |
| Fig. 4: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von Fettsäuresynthetase-Präparationen aus <u>SC 9</u> sowie aus <u>fas1-1343</u> nach der ersten und nach einer zweiten Sedimentation | 39           |
| Fig. 5: Acetyl- und Malonyl-Bindungsstellen der Fettsäuresynthetase, sowie mögliche Transacetylase-Reaktion für Acetat und Malonat                                                     | 50           |
| Fig. 6: Absorptionsspektren von FMN, sowie von gereinigter Fettsäuresynthetase aus Wildtyp- und <u>fas1-1923</u> Zellen                                                                | 54           |
| Fig. 7: Anregungsspektrum von nativer Fettsäuresynthetase aus Wildtyp und von <u>fas1-1923</u> Zellen, sowie von Trichlor-essigsäure-gefällter <u>fas1-1923</u> Fettsäuresynthetase    | 56           |
| Fig. 8: Emissionsspektrum von Fettsäuresynthetase aus Wildtyp, aus <u>fas1-1923</u> sowie von freiem FMN                                                                               | 57           |
| Fig. 9: Absorptionsspektren von verschieden lange gelagerten Proben <u>fas1-1923</u> Fettsäuresynthetase                                                                               | 59           |
| Fig. 10: Immunpräzipitationskurve von Fettsäuresynthetase nach Heidelberger                                                                                                            | 62           |
| Fig. 11: Rohruckergradienten-Profile von gereinigten <sup>14</sup> C-Pantetheinmarkierten Fettsäuresynthetasen aus Wildtyp und verschiedenen <u>fas2</u> -Mutanten                     | 76           |

|                                                                                                                                                         | <u>Seite</u> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| Fig. 12: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-Fettsäuresynthetase aus Bierhefe nach DMMA-Spaltung | 95           |
| Fig. 13: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von $^{14}\text{C}$ -Pantethein-markierter Fettsäuresynthetase nach DMMA-Spaltung                     | 96           |
| Fig. 14: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von Jodacetamid-behandelter Fettsäuresynthetase aus <u>SC 167</u> Wildtyp-Hefe nach DMMA-Spaltung     | 97           |
| Fig. 15: Ouchterlony-Doppeldiffusionsanalyse von nativer und denaturierter Fettsäuresynthetase sowie ihrer Unter-einheiten $\alpha$ und $\beta$         | 103          |
| Fig. 16: Wachstumsverhalten der in Tab. 8 enthaltenen <u>fas</u> -Mutanten und Wildtyp-Stämme im Fettsäure-freien Medium                                | 109          |
| Fig. 17: Reinigung des rückgebildeten Fettsäuresynthetase-Komplexes aus dem Reassoziationsgemisch durch Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation        | 113          |
| Fig. 18: Intergene und intragene Komplementation von <u>fas1</u> - und <u>fas2</u> -Mutanten in vivo                                                    | 121          |
| Fig. 19: <u>In vivo</u> Komplementation zwischen Pantethein-freien <u>fas2</u> -Mutanten der Komplementationsgruppen VII und X                          | 136          |
| Fig. 20 a-c: Aktivierung Pantethein-freier, hybrid zusammengesetzter Fettsäuresynthetase durch Heferohextrakt in Gegenwart von Coenzym A                | 138          |
| Fig. 21 a-c: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von reassozierten Pantethein-freien Hybrid-Fettsäuresynthetasen nach DMMA-Spaltung                | 141          |

|                                                                                                                                                                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Fig. 22 a-b: Rohrucker-Dichtegradienten-<br>zentrifugation gereinigter Fettsäure-<br>synthetase-Präparationen aus Bäcker-<br>hefe, welche ein Mal mit Glasperlen,<br>das andere Mal mit flüssiger Luft<br>aufgeschlossen worden war | 150 |
| Fig. 23: Fällung von Fettsäuresynthetase mit<br>Polymin P aus dem Zellextrakt von<br>Bierhefe und Wildtyp <u>SC 167</u>                                                                                                             | 152 |
| Fig. 24: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifu-<br>gation von gereinigter Fettsäuresyn-<br>thetase im Ausschwingrotor SW 27 und<br>im Vertikalrotor TV 850                                                                             | 153 |

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

|                   |                                                                                                                                                               |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| a/α               | Paarungstyp                                                                                                                                                   |
| ADA               | N-(2-Acetamino)-iminodiessigsäure                                                                                                                             |
| ade               | Adenin                                                                                                                                                        |
| Å                 | Angström ( $10^{-10}$ m)                                                                                                                                      |
| $^{14}\text{C}$   | Kohlenstoffisotop 14                                                                                                                                          |
| CoA, CoA-SH       | Coenzym A                                                                                                                                                     |
| CRM               | Kreuzreagierendes Material                                                                                                                                    |
| Ci                | Curie                                                                                                                                                         |
| DMMA              | Dimethylmaleinsäureanhydrid                                                                                                                                   |
| DTT               | Dithiothreit                                                                                                                                                  |
| E                 | Eine Einheit "E" eines jeden Enzyms ist diejenige Enzymmenge, welche die Umwandlung von 1 μMol Substrat pro Minute unter definierten Bedingungen katalysiert. |
| ΔE                | Extinktionsänderung                                                                                                                                           |
| EDTA              | Äthylendiamintetraceessigsäure                                                                                                                                |
| E <sub>260</sub>  | Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge 260 nm.                                                                                                            |
| FAD               | Flavin-adenindinikleotid.                                                                                                                                     |
| fas               | Gensymbol für Fettsäuresynthetase-Loci                                                                                                                        |
| FMN               | Riboflavin-5-phosphat                                                                                                                                         |
| FMNH <sub>2</sub> | Riboflavin-5-phosphat reduziert                                                                                                                               |
| FSS               | Fettsäuresynthetase                                                                                                                                           |
| x g               | fache Erdbeschleunigung                                                                                                                                       |

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| g               | Gramm                                                  |
| (g/g)           | Gewichtsverhältnis                                     |
| (g/v)           | Gewicht / Volumen                                      |
| h               | Stunde                                                 |
| HEPES           | N-2'-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure          |
| JAA             | Jodacetamid                                            |
| IpM             | Impulse pro Minute                                     |
| kg              | Kilogramm                                              |
| ml              | Milliliter                                             |
| nm              | Nanometer ( $10^{-9}$ m)                               |
| NADPH + $H^{+}$ | Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat reduziert. |
| PMSF            | Phenylmethylsulfonylfluorid                            |
| Polymin P       | Polyäthylenimin monomer Practica                       |
| SC              | Saccharomyces cerevisiae                               |
| SDS             | Dodecylsulfat-Natriumsalz                              |
| TCA             | Trichloressigsäure                                     |
| thr             | Threonin                                               |
| Tris            | Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan                       |
| ura             | Uracil                                                 |
| UpM             | Umdrehungen pro Minute                                 |
| UV              | Ultraviolett Licht                                     |
| (v/v)           | Volumenverhältnis                                      |
| WT              | Wildtyp                                                |
| YEP             | Hefeextrakt / Pepton / Rohrzucker-Vollmedium           |

YEP-FS

Fettsäurehaltiger Hefeextrakt / Pepton /  
Rohrzucker-Vollmedium

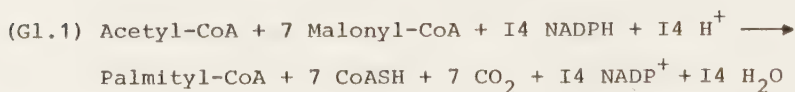


## I. EINLEITUNG

Das Multienzymssystem Fettsäuresynthetase kommt in der Natur grundsätzlich in 2 verschiedenen Organisationsformen vor: als Multienzymkomplex und als System-unabhängige Einzelenzyme <sup>1-5)</sup>. Letzteres findet man in den meisten Bakterien <sup>6)</sup>, in den Chloroplasten grüner Pflanzen und in Euglenazellen <sup>7, 8)</sup>. Als stabile Multienzymkomplexe isolierbar sind auf der anderen Seite die Fettsäuresynthetasen aus Eukaryonten-Zellen, wie z.B. diejenigen aus Tieren und Pilzen <sup>10)</sup> und auch die aus einigen wenigen Bakterien <sup>11)</sup>. Die Molekulargewichte dieser Fettsäuresynthetase-Multienzymkomplexe liegen bei höheren Eukaryonten wie Insekten <sup>2)</sup>, Vögeln <sup>13)</sup> und Säugetieren <sup>14)</sup> im Bereich von  $0,4 - 0,6 \times 10^6$  Dalton, bei den eukaryontischen Einzellern Hefe <sup>15)</sup> und Neurospora crassa <sup>16)</sup> sowie bei Mycobacterium smegmatis <sup>17)</sup> und Corynebacterium diphtheriae <sup>18)</sup> bei  $2,0 - 2,5 \times 10^6$  Dalton.

Der hinsichtlich Struktur und Funktion am besten charakterisierte Fettsäuresynthetase-Komplex dürfte dank der Arbeiten des Lynen'schen Laboratoriums die Fettsäuresynthetasen der Hefe sein. Das Studium dieses Komplexes hat grundlegende Beiträge zum Verständ-

nis der Reaktionen geliefert, nach denen die Fettsäurebiosynthese abläuft. Der Reaktionsprozeß als ganzes läßt sich durch folgende Gleichung ausdrücken:



Diese Gesamtreaktion besteht im einzelnen aus 7 aufeinander folgenden Zyklen, wobei die wachsende Fettsäurekette jeweils um 2 Kohlenstoffatome verlängert wird. Die Reaktionen jedes Zyklus werden stets durch dieselben Teilenzyme katalysiert.

Eine schematische Darstellung der Teilreaktionen, die mit Substratmodellen in vitro simuliert werden können, ist in Fig.1 dargestellt.

Nach diesem Schema wird der Syntheseprozess dadurch gestartet, daß ein Acetylrest von Acetyl-CoA über die sog. "zentrale" (SHc) auf die sog. "periphere" (SHp) SH-Gruppe des Komplexes übertragen wird<sup>19)</sup>. Die "periphere" SH-Gruppe gehört einem Cysteinrest im aktiven Zentrum des kondensierenden Teilenzym an. Als nächstes wird ein Malonylrest von Malonyl-CoA auf die wieder frei gewordene "zentrale" SH-Gruppe übertragen. Diese Gruppe ist Teil des kovalent an das "Acyl

Carrier Protein" (ACP) gebundenen 4'-Phosphopantetheins. Die in dieser Weise an das Enzym gebundene Acetyl- und Malonylreste kondensieren dann unter Abspaltung von  $\text{CO}_2$  zu 4'-Phosphopantetheingebundener Acetessigsäure. Diese wird anschließend durch das Teilenzym  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase unter Beteiligung von NADPH zu  $\beta$ -Hydroxybuttersäure reduziert, die dann im aktiven Zentrum der Dehydratase zu Crotonsäure dehydratisiert wird. Die darauf folgende zweite Reduktion mit NADPH unter Beteiligung von FMN führt schließlich zur Bildung von enzymgebundener Buttersäure, die zum Beginn eines neuen Verlängerungszyklus wieder auf die "periphere" SH-Gruppe übertragen wird. Der neue Zyklus wird dann durch die Aufnahme eines zweiten Malonylrestes eingeleitet. Nach Erreichen einer Kettenlänge von 16 oder 18 Kohlenstoffatomen wird im Falle der Fettsäuresynthetase der Hefe mit Hilfe des Teilenzym *Palmitoyl-Transferase* die fertige Fettsäure vom Enzym auf Coenzym A zurückübertragen. Man kann annehmen, daß die über das 4'-Phosphopantethein vermittelte kovalente Verankerung der verschiedenen Intermediate in dem Multienzymkomplex auf Grund der Länge (ca. 20 Å) und Flexibilität dieser prosthetischen Gruppe den Kontakt der wachsenden Fettsäurekette mit den einzelnen aktiven Zentren des Multienzymkomplexes erlaubt.

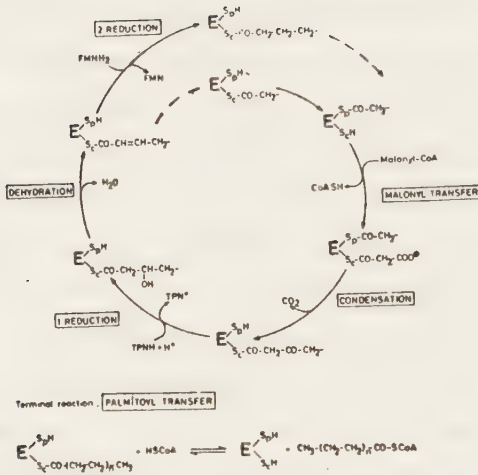


Fig. 1: Schematische Darstellung des Reaktionsablaufes, welcher am Fettsäuresynthetasekomplex zur Verlängerung einer Fettsäurekette um 2 C-Atome führt 12).

Die Untersuchungen zum Mechanismus und der Regulation der Fettsäuresynthetase-Aktivität in Hefe wurde hauptsächlich durch Lynen und Mitarbeiter durchgeführt. Im hiesigen Institut wurden dagegen seit einigen Jahren vor allem Fragen der genetischen Kontrolle der Biosynthese dieses Komplexes bearbeitet.



Vor allem durch die Verwendung geeigneter, Fettsäuresynthetase-defizienter Mutanten konnte gezeigt werden, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe durch zwei unabhängige und jeweils komplexe Genloci, fas1 und fas2, kodiert wird <sup>20)</sup>. Fas1 kodiert die Untereinheit  $\beta$ , fas2 die Komponente  $\alpha$  des Komplexes. Der intakte Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe hat die Zusammensetzung  $\alpha_6\beta_6$  <sup>21)</sup>. Die biochemisch-genetische Untersuchung einer ersten Serie von fas1 und fas2 -Mutanten hatte zum Nachweis von 9 verschiedenen Komplementationsgruppen und zur Identifizierung von Defektmutationen fast aller biochemischen Funktionen des Synthetase-Komplexes geführt <sup>22)</sup>. Die einzige bisher noch nicht charakterisierte Synthetase-Mutation war eine solche des Acetyltransferase-Teilenzym. Eine spätere, noch ausführliche Komplementationsanalyse mit einer sehr großen Zahl neu isolierter fas-Mutanten hatte zum Nachweis weiterer Komplementationsgruppen geführt <sup>25)</sup>. Die biochemische Charakterisierung einiger dieser neuen fas-Komplementationsgruppen war somit das erste Ziel der vorliegenden Arbeit. Dabei sollte geklärt werden, ob es sich dabei um bisher noch nicht charakterisierte Defekte, wie etwa solche des Acetyltransferase-Teilenzym handelte (vgl. Fig.2).

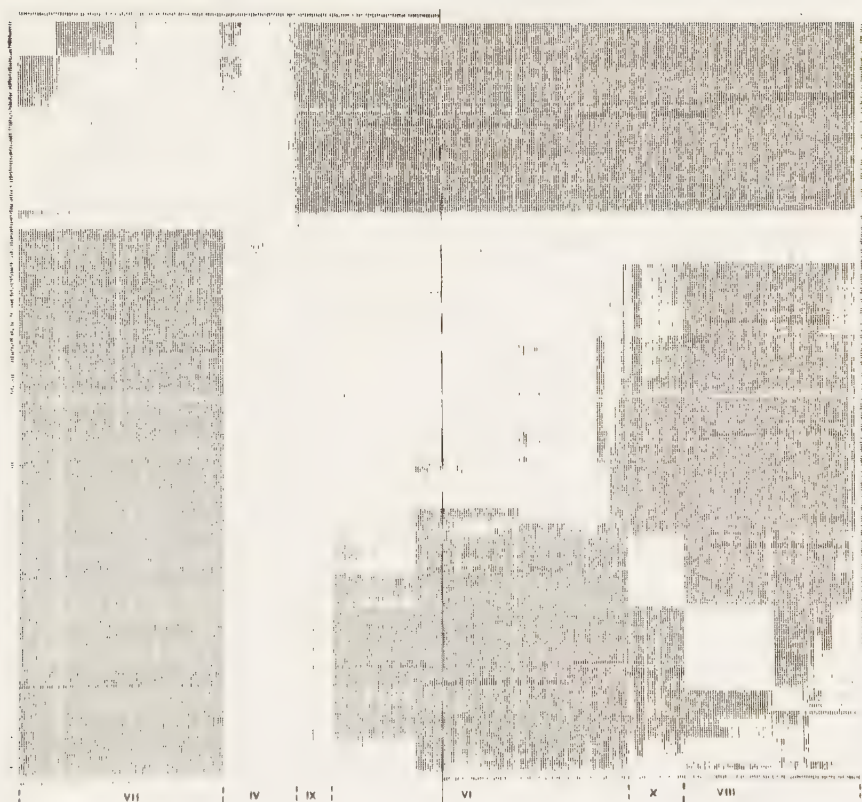


Fig. 3: fas2-Komplementationskarte

Bezeichnung siehe Fig. 2

Die Komplementationskarten der Fig. 2 und 3 sind wesentlich größer und deutlicher dem Buch von H. Bisswanger <sup>28)</sup> als Faltkarten beigelegt.

Ein weiteres, bisher in Hefe noch nicht nachgewiesenes Enzym, das für die Biosynthese eines aktiven Fettsäuresynthetase-Komplexes wird, ist die Coenzym A: Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase, welche die Wirkungsgruppe des Acyl Carrier Proteins von Coenzym A auf das Fettsäuresynthetase-Apoenzym überträgt. Vagelos hatte als erster in E. coli eine derartige Enzymaktivität nachgewiesen<sup>26)</sup>. Der Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe enthält 5 - 6 Mole 4'-Phosphopantethein an die fas2-kodierte  $\alpha$ -Untereinheit gebunden<sup>24)</sup>. Pantethein-freie fas2-Mutanten sind schon seit längerem bekannt, es wurde jedoch bisher angenommen, daß in ihnen die  $\alpha$ -Untereinheit ihre Bindungsfähigkeit für die prosthetische Gruppe eingebüßt hat und nicht, daß es sich hier um Phosphopantethein-Transferase Mutanten handelte<sup>23)</sup>. Ein endgültiger Beweis stand allerdings noch aus. Er wäre zu führen etwa durch die Identifizierung einer weiteren Klasse Pantethein-freier Fettsäuresynthetase-Mutanten und durch den biochemischen Nachweis der Anwesenheit oder des Fehlens von Transferase-Aktivität in den entsprechenden Mutanten (vgl. Fig. 3).

Durch die Arbeiten von Wieland und Lynen war es neuerdings möglich geworden, den Fettsäuresynthetase-Komplex aus Hefe reversibel in seine Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zu dissoziieren und diese anschließend wie-

der zum aktiven Enzymkomplex zu reassoziieren<sup>27)</sup>. Mit Hilfe dieser Methode sollte schließlich versucht werden geeignete Mutanten-Enzyme miteinander zu re-kombinieren und so eine in vitro Komplementation durchzuführen. Ziel einer solchen Konstruktion hybrider Fettsäuresynthetase-Komplexe im Reagensglas war es, Aufschluß über die Bedeutung von Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb eines Komplexmoleküls zu erhalten und zum anderen, durch Verwendung geeigneter Pantethein-freier Mutantenenzyme eine Apo-Fettsäuresynthetase zu synthetisieren, welche in einem zu entwickelnden Phosphopantethein-Transferasetest eingesetzt werden könnte.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### I. Die folgenden Geräte wurden verwandt:

Ultrazentrifuge (Beckmann L 5 - 65), Kühlzentrifugen (Sorvall Superspeed RC - 5, Beckmann J - 21 B), Tischzentrifuge (Haereus Christ Labofuge II), Schnellzentrifuge f. 70 Ltr. Kulturen (Carl Padberg Type 41), Fraktionssammler (LKB Ultrorac 7000, Gilson Microcol TDC 80), Schlauchpumpen (Ismatec Saia AG; Verder Vleuten, Holland), Flüssigkeitszintillationszähler (Packard Tri-carb 3320), pH-Meter (Knick Type 511), Membranfiltrationsgeräte (Amincon N.V.), Waagen (Mettler P 1000N, P 1200, Bizerba-6 kg), Mikrowaage (Sartorius 2414), Automatik-Pipetten (Gilson Pipetman), Zellhomogenisator (Braun Melsungen Type 853 038), Filter-Photometer (Eppendorf Modell 1101 M mit Kompensationsschreiber 4412), Kolorimeter zur Zelldichtemessung (Klett-Sumerson-MFG.Co.INC. N.Y. U.S.A. Type 800-3), Mixer (Braun Haushaltsmixer Type MX 32 mit Metallgefäß (Selbstanfertigung)), Spektralphotometer (Gilford 250 mit Recorder 1100, Aminco DW-2 UV/VIS) Homogenisator für Proteinniederschläge (Sorvall Omni-Mixer 17106 mit Micro-Homogenizer Attachment), Mikroskop (Zeiss Standard 14), Autoklaven (Webeco Type A 5, Melag Type 23), Schüttler (New Brunswick Modell G 25 und Modell G 10 thermostatisiert), Gradientenmischer (Hölzel), Rotationsverdampfer (Büchi Rotovapor-R), Magnetrührer (IKA-Combimag RCO), Fermenter (Chemap AG Zürich 75 l), Dampferzeuger (P. Loos Offenbach a.M. 18 KW), UV-Lampe (Desaga Min UVIS), Ultraschallgerät (Branson Sonic Power Company Sonifier B-12), Tiefkühltruhe - 70°C (Köttermann), Wasserbäder (Braun Thermomix 1440 Juchheim Exatherm U 3 electronic),

Brutschrank (Heraeus Type VT 5050 EK), Spritzen für Sterilisation (Sartorius Ultra-Aspekt mit Filterhalter (Metall) Ø 25 mm Pneumatische Spritze Antlia SP 050/2 mit Filterhalter (Plastik) Ø 50 mm).

## 2. Enzyme und Chemikalien

(a) Die folgenden Substanzen wurden gekauft:

Enzyme (Firma Böhringer, Mannheim), Komplettes Freud'sches Adjuvans (Difco Laboratories, Detroit), 2,5-Diphenyloxazol (PPO), Soluene-100 (Packard Instruments, Frankfurt), 1,4-Di- (2-(4-methyl-5 phenyloxyzoly)) - benzol (POPOP) (Koch-Light Laboratories Ltd. Colnbrook), Dithiothreit, Dextran Blau, Serumalbumin vom Rind, Agarose reinst,  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  p.A., Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan p.A., Dowex WX2  $\text{H}^+$ , Silicon-Antischaum, Thioglycolsäure, Riboflavin-5-phosphat Na-Salz, N-2-Hydroxyäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure (Hepes), Polyäthylenimin pract. PEI-600 (Polymin P) (Serva, Heidelberg), Trichloressigsäure, Hefeextrakt, Pepton (Firma C. Roth, Karlsruhe), Dimethylmaleinsäureanhydrid, D(-) Pantolacton, D(-) Pantethein, N-Acetyl-S-Acetacetylcysteamin (Sigma, München), Yeast Nitrogen Base, Agar-Agar, Bacto-Peptone (Difco), 0,1 % Ninhydrinsprühreagens, Saccharose reinst, DC-Alufolie Kieselgel F 254, Phenylmethansulfonylfluorid, Essigsäureanhydrid, Thioessigsäure (Merck, Darmstadt), Aethylenimin monomer (Ferak, Berlin), Acetylphosphat,

NADH, NADPH, FAD, N-(2-Acetamino)-iminodisigsäure (ADA), N-Acetyl-L-Cystein (Boehringer, Mannheim), Radiochemikalien (Firma NEN und The Radiochemical Centre, Amersham), Quickszint 212 (Zinsser, Frankfurt), Sephadex G 25 u. G 50 Superfine (Pharmacia, Freiburg).

Antiserum gegen Kaninchen- $\gamma$ Globulin von der Ziege, Antiserum gegen Kaninchen- $\gamma$ Globulinforte von der Ziege, DL- 3,4 Dihydroxyphenylalanin (DL-DOPA) von den Behringwerken, Marburg.

Die Nitrocellulosefilter  $\varnothing$  25 mm, Porengröße 0,45  $\mu$ m und  $\varnothing$  50 mm, Porengröße 0,30  $\mu$ m für die Sterilfiltration, waren von der Firma Sartorius Göttingen.

Glasperlen (Reflexperlen) für den Zellaufschluß Größe 31/6 0,45-0,5 mm, Größe 31/11 0,25-0,30 mm waren von dem Dragon Werk J. Wild GmbH, Bayreuth.

Die Hefen waren Bierhefe der Firma Kitzmann oHG, Erlangen und die Bäckerhefe der Firma Bast, Nürnberg, die uns dankenswerter Weise kostenlos zur Verfügung gestellt wurden.

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien stammten von der Firma Merck, Darmstadt und waren von der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe.

Stickstoff flüssig, erhielten wir vom Institut für Anorganische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

$\beta$ -Butyrolacton wurde uns freundlicher Weise von Prof. Dr. Vilsmaier am Institut für Organische Chemie zur Verfügung gestellt.

- (b) Die folgenden Substanzen standen zur Verfügung:

N,S-Diacetyl-cysteamin Fp  $27^{\circ}\text{C}$ , S-Malonyl-N-caprylcysteamin Fp  $65-66^{\circ}\text{C}$ , N-Acetyl-S-Acetylacetylcysteamin,  $1-^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA, N-Acetyl-S-Crotonyl-Cysteamin.

- (c) Die folgenden Substanzen wurden hergestellt:

$^{14}\text{C}$ -Pantothensäure wurde aus  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -Alanin und Pantolacton nach Schweizer (30) hergestellt. Die Ausbeutebestimmung erfolgte durch Dünnschicht-Chromatographie. (Kieselgel auf Aluminiumfolie) mit Äthanol/ $\text{H}_2\text{O}$  - 67/37 (g/g) als Fließmittel (29). Das Chromatogramm wurde durch Besprühen der getrockneten Kieselgelfolie mit 10 % TCA, anschließendes Trocknen bei  $110^{\circ}\text{C}$  für 10 min und danach Besprühen mit Ninhydrinlösung (0,1 %) und nochmaliges Trocknen 5 - 7 min bei  $85^{\circ}\text{C}$  entwickelt. Pantothensäure weist einen Rf-Wert von 0,6,  $\beta$ -Alanin einen solchen von 0,29 auf.

Falls die Umsetzung nicht vollständig gewesen war, wurde restliches  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -Alanin von der gebildeten  $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure durch Ionenaustausch-Chromatographie (Dowex 50,  $\text{H}^+$  Form) abgetrennt.

$^{14}\text{C}$ -Benzoyl-CoA wurde nach Schweizer (30) dargestellt. Die spezifische Radioaktivität der in 2 verschiedenen Ansätzen erhaltenen Präparate betrug  $4,7 \times 10^5$  IpM/ $\mu\text{Mol}$  bzw.  $2 \times 10^6$  IpM/ $\mu\text{Mol}$ . Die Gehaltsbestimmung erfolgte optisch bei 260 nm mittels  $E_{260} = 16 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$  (32).

Malonyl-CoA wurde durch Umesterung von N-Capryl-S-Malonyl-Cysteamin mit CoA-SH im Unterschluß hergestellt (33). Der Gehalt wurde optisch mit Hilfe des Fettsäuresynthetasetestes ermittelt.

Pantethein wurde durch Reduktion von Pantethin mit Natriumborhydrid nach Vagelos (34) dargestellt.

S-Acetylpantethein wurde aus Essigsäureanhydrid und Pantethein dargestellt (35). Gehaltsbestimmung über die Thioesterabsorption bei 232 nm  $E_{232} = 4,6 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$  (32).

Myristyl-CoA wurde nach Schweizer (37) bzw. Seubert (38) dargestellt. Gehaltsbestimmung entsprechend der von Benzoyl-CoA.

N-Acetyl-Cysteamin wurde nach Kuhn (36) hergestellt.

N-Acetyl-D, L-S:-Hydroxybutyryl-Cysteamin wurde nach Decker (31) hergestellt. Die Gehaltsbestimmung erfolgte über die Absorption bei 263 nm,  $E_{263} = 4,1 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$  (39).

Calciumphosphat-Gel wurde im doppelten Ansatz (20 L) hergestellt (40).

Butterhydrolysat wurde hergestellt, indem 250 g Butter zusammen mit 62,5 g KOH-Plätzchen (gelöst in 125 ml Methanol), Siedesteinchen und 2 ml Silicon-Antischaum im 1 Liter Rundkolben 3 Stunden unter Rückfluß gekocht wurden (68).

### 3. Hefestämme

Tab.22: In der vorliegenden Arbeit benutzte *Saccharomyces cerevisiae* Stämme. Die von SC 167 abgeleiteten fettsäurebedürftigen Mutanten (fas-Mutanten) stammten aus der Instituts-eigenen Kollektion.

| Stamm  | Herkunft      | Original-bezeichnung | Genotyp        |
|--------|---------------|----------------------|----------------|
| SC 9   | R.K. Mortimer | X 2180-1 A           | a Wildtyp (1n) |
| SC 18  | M. Esposito   |                      | a ade 1        |
| SC 167 | aus SC 18     |                      | ade 1          |
| SC 109 | R.K. Mortimer | AM 33                | thr 1 arg 1    |
| SC 177 | aus SC 109    |                      | a thr 1        |

### 4. Medien

(a) Hefeextrakt - Pepton - Medium (YEP)

Feste Nährböden: 5 % Saccharose (42) (Haushalts-

zucker), 0,75 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt,  
0,5 %  $K_2HPO_4$ , 0,5 %  $KH_2PO_4$ , 2 % Agar

Flüssigmedium: 5 % Saccharose, 0,75 % Pepton,  
0,5 % Hefeextrakt.

(b) Hefeextrakt - Pepton - Fettsäure Medium (YEP-FS)

Die Zusammensetzung von Fest- und Flüssigmedien  
wie unter (a), jedoch mit zusätzlicher Zugabe  
von jeweils 1 % Tween 40 und 0,03 % Butterhy-  
drolysat.

(c) Minimal Medium

Feste Nährböden: 0,75 % Yeast Nitrogen Base, 5 %  
Saccharose, 0,5 %  $KH_2PO_4$ , 0,5 %  $K_2HPO_4$ , 2 % Agar.  
Einzelne Aminosäuren werden nach Bedarf supple-  
mentiert. Adenin 10 mg/l, Histidin 10 mg/l,  
Threonin 300 mg/l.

Flüssigmedium: 0,75 % Yeast Nitrogen Base, 5 %  
Saccharose.

(d) Minimal - Fettsäure Medium

Die Zusammensetzung von Fest- und Flüssigmedien  
wie unter (c), jedoch mit zusätzlicher Zugabe  
von jeweils 1 % Tween 40 und 0,03 % Myristin-  
säure.

(e) Synthetisches Fettsäure Minimalmedium nach MÜCKE (43) enthielt:

|                                 |       |      |                                                 |      |      |
|---------------------------------|-------|------|-------------------------------------------------|------|------|
| Saccharose                      | 50    | g/l  | FeCl <sub>3</sub>                               | 2,5  | mg/l |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,55  | g/l  | K <sub>3</sub> -Citrat                          | 5,0  | g/l  |
| MgSO <sub>4</sub>               | 0,125 | g/l  | Zitronensäure                                   | 1,0  | g/l  |
| CaCl <sub>2</sub>               | 0,125 | g/l  | (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 3,75 | g/l  |
| KCl                             | 0,4   | g/l  | Tween 40                                        | 10   | g/l  |
| MnSO <sub>4</sub>               | 2,5   | mg/l | Myristinsäure                                   | 0,3  | g/l  |

Vitamine: Inosit 25 mg/l, 0,02 mg/l D(+)-Biotin  
Thiamin-HCl 0,4 mg/l, Ca-Pantothenat 1,2 µMol/l.  
Zur radioaktiven Markierung wurde unmarkiertes  
Ca-Pantothenat durch <sup>14</sup>C-Pantothensäure (1,2 µMol/l  
= 3,5 µCi/l) ersetzt. Von den einzelnen Vitaminen  
wurde eine 100fach konzentrierte Stammlösung her-  
gestellt, bei -25° C tiefgefroren aufbewahrt und  
daraus die entsprechende Menge dem Medium zugege-  
ben. Die zu supplementierende Aminosäure wurde in  
der unter (f) angegebenen Konzentration ebenfalls  
dem Medium zugegeben. Die gesamte Zugabe erfolgte  
nach dem Erkalten des Mediums mittels Sterilfiltra-  
tion.

(f) Festes synthetisches Selektiv-Medium

Zur Bestimmung der Wachstoffs-Bedürfnisse bestimm-  
ter fas-Mutanten wurden Selektiv-Nährböden ver-  
wandt, in welchen einem synthetischen Medium (d)  
zusätzliche folgende L-Aminosäuren bzw. Purin-  
oder Pyrimidinbasen zugegeben wurden (mg/l):

Adenin 10, Uracil 10, Leucin 60, Isoleucin 60, Threonin 300, Tyrosin 50, Methionin 10, Histidin 10, Arginin 75, Lysin 60, Phenylalanin 60, Valin 60.

Tryptophan 10 mg/l und Asparagin 60 mg/l wurden nach der Sterilisation mittels Sterilfiltration zugegeben.

(g) "Weglass"-Medium:

Zusammensetzung wie Medium (f), jedoch wurde, je nach Bedarf, ein bestimmter Nährstoff weggelassen.

Die Sterilisation aller Medien erfolgte bis zu 1,5 Ltr. während 30 min bei 1,2 atü/120<sup>0</sup> C in einem WEBECO-Autoklaven Typ A5. Zahnstocher und kleinere Mengen Medium (10 - 100 ml) im MELAG-Autoklaven Typ 23 während 30 min bei 1,2 atü/120<sup>0</sup> C.

Im 75 Ltr.-CHEMAP-Fermenter wurde zuerst die Zuluft-Filterkerze mit strömendem Wasserdampf 45 min lang, danach das Medium während 30 min bei 1,2 atü/120<sup>0</sup> C, sterilisiert.

## 5. Komplementationsanalysen

(a) Die Komplementationsanalysen von fas-Mutanten wurden nach der bei Kühn (44) beschriebenen Methode durchgeführt.

(b) Die Herstellung von diploiden Hefezellen erfolgte durch Kreuzung von haploiden Mutanten entgegenge-

setzten Paarungstyps und unterschiedlicher Wuchsstoff-Bedürfnisse auf YEP bzw. YEP-FS Agar. Diploide wurden anschließend von Hapliden anhand ihrer Fähigkeit, auf Minimal-Agar zu wachsen, abgetrennt.

#### 6. Feststellung der Wuchsstoff-Bedürfnisse von fas-Mutanten

Nach Anzucht der betreffenden Mutanten auf YEP-FS Agar bei 30° C wurden die jeweiligen Wuchsstoff-Bedingungen durch Replica Plattierung (45) zwischen Komplett- und Weglass-Medium ermittelt

#### 7. Allgemeine analytische Methoden

##### (a) Proteinbestimmungen

Für Proteinbestimmungen wurde gewöhnlich die Biuret-Methode nach Beisenherz et al. (46) oder die Mikrobiuret-Methode nach Itzhaki und Gill (47) verwendet. Der Proteingehalt in verdünnten Lösungen und in den Fraktionen der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation wurde nach der Methode von Warburg und Christian bestimmt (48). Als Faktor für die FSS wurde der Wert 1,1 benutzt ( $A_{280} \times 1,1 = \text{mg/ml}$ ).

(b) Radioaktivitätsbestimmungen von  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen wurden im Flüssigkeitszintillationszähler gemessen. Für Trägergebundene-Proben (Membran, Filterpapier) wurde eine Toluol-Szintillationslösung (5 g PPO und 0,5 g POPOP in

1 Liter Toluol gelöst), für wässrige Proben entweder Bray-Szintillator (5 g PPO, 0,5 g POPOP, 60 gNaphthalin, 20 ml Äthylenglycol, 100 ml Methanol mit Dioxan ad 1000ml) oder Quickszint 212 benutzt.

## 8. Immunologische Methoden

- (a) Gewinnung von Antikörpern gegen Fettsäuresynthetase. Die Proteinproben (gereinigte FSS) lagen in gepufferter 0,01 M Kalium-Phosphatpuffer (pH 6,5) blutisotonischer Kochsalzlösung vor. Zur Erst-Immunisierung wurde die Proteinlösung im Verhältnis 1:1 (v/v) mit komplettem Freud'schen Adjuvans versetzt und mittels Ultraschall gründlich gemischt. Die Tiere waren käufliche Stallhasen.

Pro Tier wurden zunächst 2,5 mg FSS intramuskulär in den Hinterlauf gespritzt (1,0 ml Gesamtvolumen Nadel Gr. 1). Nach ca. 4 Wochen wurde die I. "Booster"-Injektion mit 2 mg FSS je Tier in die Ohrvene (0,5 ml Gesamtvolumen Nadel Gr.16) vorgenommen. 14 Tage danach wurde mit nochmals 2,5 mg FSS je Tier eine weitere "Booster"-Injektion in die Ohrvene durchgeführt (0,5 ml Volumen). Nach weiteren 14 Tagen wurden die Tiere getötet und ausgeblutet. Aus 2 Hasen wurden 120 ml Serum mit dem Titer I : 32 gewonnen (49).

- (b) Immun-Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (51). Zur Herstellung der Agaroseplatten wurden 0,175 g Agarose in 25 ml Borat-Kochsalzpuffer (50) bei 80° C gelöst. Borsäure 6,184 g, Natriumtetraborat

10 H<sub>2</sub>O 9,536 g, NaCl 4,384 g, ad 1000 ml pH 8,4 - 8,5. Falls nötig mit verdünnter HCl oder NaOH nachstellen. Borat-Kochsalz Puffer pH 8,4 : 5 Teile Borat-Puffer pH 8,4 werden mit 95 Teilen isotonischer NaCl-Lösung (0,9 %) gemischt (50). Je 6 ml wurden auf eine 5 x 5 cm Glasplatte heiß mit einer 10 ml Pipette aufgetragen. Zum Erstarren wurde die Lösung 30 min bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurde das Lochmuster in die Agarose-schicht eingestantzt. Zur Untersuchung von Rohextrakten wurden Löcher mit 8 mm Ø gestantzt, die 80 - 100 ul aufnehmen konnten. Der Abstand der peripheren Löcher zum Zentralloch ist gleich dem Durchmesser der Löcher. Die Diffusion fand während 24 - 48 Stunden bei Raumtemperatur in einer geschlossenen, feuchten Petrischale statt. Zur Präzipitationsverstärkung bei Titerbestimmungen wurde die DOPA-Methode verwendet (52).

- (c) Die Bestimmung des Äquivalenzpunktes (Heidelbergerkurve) wurde nach der bei Campbell beschriebenen Methode (50) durchgeführt. Die maximale Präzipitatbildung wurde für 1 mg FSS in 2 ml Borat-Puffer pH 8,4 mit 0,125 ml Antiserum erreicht.
- (d) Immunpräzipitation von <sup>14</sup>C-Pantothensäure-markierter FSS aus dem Rohextrakt von fas-Mutanten nach der Doppelantikörper-Methode.  
2-<sup>14</sup>C-Pantothensäure-markierte Rohextraktproben mit jeweils 20 bzw. 40 mg Protein (entsprechend

100 bzw. 200 µg Fettsäuresynthetase (53)) wurden mit 400 bzw. 300 µg gereinigter, unmarkierter Fettsäuresynthetase (6 mg/ml in 50 % Glycerin, 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6,8, ohne Reduktionsmittel) versetzt (Gesamtvolumen max. 0,5 ml) und mit Stabilisierungspuffer (0,1 % Rinderserumalbumin in Boratpuffer) auf 1,0 ml aufgefüllt. Dazu wurden 0,066 ml Kaninchen-Serum zugegeben, gemischt und 1/2 Stunde bei 37° C inkubiert. Daran anschließend wurden 0,2 ml Ziegenserum gegen γ-Globulin vom Hasen ("forte") hinzugefügt und 30 Stunden bei 4° C inkubiert (54). Das Immunpräzipitat wurde bei 4° C 20 min lang bei 1500 x g abentrifugiert. Der Niederschlag wurde 1 Mal mit 0,8 ml isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und die Suspension danach 1/2 Stunde bei 4° C und 7800 x g zentrifugiert. Der trockene Niederschlag wurde in 1 ml Soluene-100 gelöst, 10 ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit zugefügt und die Radioaktivität im Tri-Carb bestimmt.

9. Nachweis des <sup>14</sup>C-Pantothensäure-Einbaus in die FSS von fas-Mutanten durch TCA-Fällung des Rohextraktes

---

Parallel zur oben beschriebenen Methode der Immunpräzipitation wurde die dort eingesetzte Menge Rohextrakt (entsprechend 200 µg FSS) auch einer TCA-Fällung unterworfen.

In einem Zentrifugenglas wurde die Proteinlösung mit 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6,8 auf 2 ml aufgefüllt. Dann wurden 0,3 ml 3 M TCA zugesetzt

und der auftretende Niederschlag in der Tischzentrifuge für 10 min bei 500 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde 2 Mal mit je 3 ml Waschflüssigkeit (Butanol : Äthanol : 0,03 N HCl = 1 : 1 : 1) (55) aus dem Zentrifugenglas herausgespült, im Omni-Mixer 30 sec bei "full speed" homogenisiert und die Suspension bei einer Temperatur von 20° C 30 min lang und bei 25.000 x g in einem 15 ml Corex-Zentrifugenglas zentrifugiert. Die Homogenisierung und Zentrifugation wurde ein zweites Mal wiederholt. Der erhaltene Niederschlag wurde in 1 ml Soluene-100 gelöst, mit 10ml Toluol-Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Tri-Carb die Radioaktivität bestimmt.

#### 10. Aufschluß von Hefezellen (57)

- (a) Aufschlußpuffer: 0,2 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4,  $10^{-3}$  M EDTA,  $10^{-3}$  M 2-Mercaptoäthanol, 1 g/l PMSF (kurz vor dem Aufschluß als Lösung von 250 mg/ml in wasserfreiem Aceton zugegeben) (56, 69).
- (b) Aufschluß größerer Mengen Hefe: zunächst wurde in einem Becherglas 1 Teil feuchte Hefe in 1,5 Teilen Aufschlußpuffer (g/v) suspendiert. In jedes Schüttelfläschchen wurde 1/3 Volumen Glasperlen (Größe 31/6) und mit der obigen Hefesuspension bis zu 2/3 des Flaschenvolumens aufgefüllt. Die verschlossenen Flaschen wurden im Eisbad vorgekühlt, dann im Braun-Zellhomogenisator 45 sec lang geschüttelt (Stufe 2 entsprechend 4000 Upm). Die Flaschen wurden im Eisbad wieder abgekühlt

und dann nochmals 45 sec bei Stufe 2 geschüttelt. Der hierbei erzielte Aufschluß lag gewöhnlich bei 60 - 80 % zerschlagener Zellen (Kontrolle im Phasenkontrast-Mikroskop).

- (c) Aufschluß kleinerer Hefemengen: für Hefemengen zwischen 2-4 g Feuchtgewicht wurden 10 ml verschraubbare Glasröhren der Firma Kimax benutzt. Die Hefe wurde im Verhältnis 1 : 1 (g/v) mit dem Aufschlußpuffer (s.o.) gemischt. Das Röhrchen wurde zur Hälfte mit Glasperlen gefüllt (2 Teile der Größe 31/6 und 1 Teil der Größe 31/11), mit Hefesuspension bis zur Schulter gefüllt und im Schütteladapter (Firma Braun-Melsungen) 5 min im Tiefkühlschrank bei  $-25^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt. Dann wurde 1 min im Homogenisator geschüttelt (Stufe 2) dann wieder im Tiefkühlschrank ( $-25^{\circ}\text{C}$ ) 5 min abgekühlt und schließlich nochmals 60 sec bei Stufe 2 geschüttelt. Der Aufschluß lag hier bei 90 % zerschlagener Zellen.

- (d) Aufschluß mit flüssigem Stickstoff (58) für größere Hefemengen ( $>200\text{ g}$ ): Die Hefe wurde in flüssigem Stickstoff gekrümelt (Dewar-Gefäß) und dann portionsweise jeweils ca. 150 g in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Haushaltsmixer zu feinem Pulver gemahlen (Stufe 3 entsprechend 17.000 UpM). Danach wurde 3 min lang auf Stufe 3 homogenisiert, wobei 2 Mal der Lauf unterbrochen wurde, um mit dem Spatel das Pulver von der Wand zu lösen. Danach wurde das Pulver in die 1,5-fache Menge raumtemperierten Aufschlußpuffer (s.o. unter a)) gegeben und bei  $22^{\circ}\text{C}$  so lange ge-

rührt, bis keine Eiskristalle mehr vorhanden waren. Die Suspension wurde dann nochmals 45 sec lang bei Stufe 3 homogenisiert.

#### 11. Lagerung von Hefezellen vor der Enzymisolierung

Aus dem Kulturmedium abzentrifugierte Hefezellen wurden, falls sie nicht sofort weiterverarbeitet werden konnten, bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Dazu wurden die Zellen entweder direkt in den Tiefkühlschrank gestellt oder zuvor, wie unter 10 d) beschrieben, in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Für eine zügige Weiterverarbeitung empfahl sich die letztgenannte Methode.

#### 12. Hefezucht und Revertantentest

- (a) Inokulum: Zellen des anzuzüchtenden Hefestammes wurden auf YEP-FS Agar ausplattiert (ca. 100 - 150 Zellen/Platte) und 48 Stunden bei  $30^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Fas-Mutanten wurden durch Überstempeln der auf YEP-FS Agar gewachsenen Kolonien auf YEP Agar und durch Inkubation der Abdrücke bei  $30^{\circ}\text{C}$  auf ihren Mutantencharakter überprüft. Ein überprüfter Einzelklon wurde dann in 10 ml YEP-FS Flüssigmedium überimpft und dieses 24 - 48 h bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Diese Vorkultur wurde danach in 2 x 1 Liter YEP-FS Flüssigmedium (Fernbachkolben) gegeben und für weitere 48 Stunden unter Schütteln bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die 2 x 1 Liter Kulturen dienten schließlich als Inokulum für den 75 Liter Fermenter.

(b) Fermenter-Kulturen: wurden gewöhnlich bei Stufe II gerührt, über Sterilfilter belüftet (59) und der Schaumabscheider immer benutzt. Die Zugabe von Silicon-Antischaum verschlechterte den Sauerstoffübertritt vom Medium in die Hefezelle erheblich (60). Bei Hefemutanten die zu starker Ausflockung neigten, wurde mit Stufe IV gerührt (77). Zur Ermittlung einer Wachstumskinetik wurden in bestimmten Zeitabständen dem Fermenter Proben steril entnommen und ihre Trübung im Klett-Sumerson Kolorimeter (Filter 420) gemessen. Gegen Ende der logarithmischen Phase wurde der Fermenter auf 15° C heruntergekühlt und die Hefezellen bei 20.000 UpM in der Padberg-Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 400 - 1000 g feuchte Zellen pro 75 Liter-Ansatz.

(c) 200 ml Kulturen für den  $^{14}\text{C}$ -Pantothersäure-Einbau in fas-Mutanten wurde zunächst wie unter a) ein Einzelklon gewonnen. Mit diesem Klon wurde dann direkt 200 ml Fettsäure-Minimalmedium angeimpft. Dieses Medium befand sich in einem 500 ml Erlenmeyerkolben, dem seitlich ein Reagensglas angeschmolzen war. Diese Kulturen wurden auf einem Schüttler bei 30° C inkubiert. Wachstumskurven wurden erstellt, indem das Medium in das angeschmolzene Reagensglas umgekippt und die Trübung im Klett-Kolorimeter bestimmt wurde. ( 1 Klett Einheit =  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ).

- (d) Revertantentest: jede Mutanten-Kultur wurde zum Zeitpunkt des Aberntens auf ihren Gehalt an fas-prototrophen Zellen (Revertanten) geprüft. Dazu wurden dem Fermenter etwa 5 ml steril entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit sterilem Wasser auf je einer YEP und einer YEP-FS-Agarplatte einmal 500 - 1000 Zellen und ein zweites Mal 50 - 100 Zellen ausgestrichen. So ließ sich meist schon nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 30° C der Gehalt an fas-prototrophen Zellen bestimmen. Für Enzymbestimmungen aus dem Rohextrakt wurden die aufgeschlossenen Zellen bei 4° C und 25.300 x g für 20 min in 15 ml Corex-Gläsern abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann 30 min im 50 Ti-Rotor bei 100.000 x g und 4° C zentrifugiert.

### 13. Bestimmung der Gesamtreaktion und der Teilaktivitäten der Fettsäuresynthetase (61)

---

Alle Aktivitäten wurden in Küvetten von 1 cm Schichtdicke und in einem Volumen von 1,0 ml bei einer Temperatur von 25° C bestimmt.

#### (a) Gesamtreaktion

(i) Eine Küvette enthielt 100  $\mu$ Mole Kalium-Phosphatpuffer pH 6,5, 1  $\mu$ Mol Dithiothreit, 0,08  $\mu$ Mole Acetat-CoA, 0,2  $\mu$ Mole NADPH, 4-10  $\mu$ g FSS. Nach Verfolgen des Blindlaufes für 3 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1  $\mu$ Mole Malonyl-CoA gestartet. Meßgröße war die Änderung der Extinktion bei 334 nm.

Für NADPH ist  $E_{334} = 6,18 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$  (62). Eine Einheit (E) ist die Menge FSS die unter Testbedingungen 2  $\mu\text{Mole}$  NADPH (entsprechend 1  $\mu\text{Mol}$  Malonyl-CoA) pro Minute umsetzt.

(ii) Als Alternative zu (i) wurde in den meisten Fällen ein billigeres, das heißt mit Modellsubstraten an Stelle der CoA-Derivate, arbeitendes Testverfahren benutzt. In Übereinstimmung mit Sumper (64) und Kresze (61) zeigte sich, daß mit Modellsubstraten 2/3 der mit Acetyl-CoA und Malonyl-CoA gemessenen Maximalgeschwindigkeit erreicht wird. Der Ansatz ist derselbe wie in Test (i), jedoch werden 0,4  $\mu\text{Mole}$  N.S-Diacetylcysteamin an Stelle von Acetyl-CoA und 1,6  $\mu\text{Mole}$  S-Malonyl-N-Capryl-Cysteamin an Stelle von Malonyl-CoA eingesetzt.

- (b)  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase wurde im optischen Test nach Lynen und Willecke (63) bestimmt.
- (c) Acetyl-Transferase wurde im optischen Test nach Weithmann (66), in der Änderung von Wieland (67), mit Malat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase als Hilfsenzyme bestimmt.
- (d) Enoyl-Reduktase wurde einmal im optischen Test nach Seubert (78) wie folgt bestimmt (Diaphorase-Test): Eine Küvette enthielt 50  $\mu\text{Mole}$  ADA-Puffer pH 6,6, 0,06 mg 2,6-Dichlorphenolindophenol-Natriumsalz (filtriert), 0,15  $\mu\text{Mole}$  NADH, 4 mg Nicotinsäureamid. Die Reaktion wurde nach 2 min Beobachtung des Blindlaufes bei 578 nm mit FSS gestartet. Für den Farbstoff ist

$$E_{578} = 14,3 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{mm}^{-1} \quad (78).$$

Ein anderer Enoylreduktase-Test wurde nach den Angaben von Weithmann (66) im Doppelstrahlphotometer bei 334 nm durchgeführt. Dabei wurden 50  $\mu\text{Mole}$  ADA-Puffer pH 6,6 an Stelle von 500  $\mu\text{Molen}$  Kalium Phosphatpuffer pH 6,5 eingesetzt (79).

- (e)  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase wurde im optischen Test nach Weithmann (66) bestimmt (Triacetsäure-lactonbildung) (80).
- (f) Dehydratase-Bestimmungen wurden nach Weithmann (66) durchgeführt. Die Messungen erfolgten im Doppelstrahlphotometer. Die Küvetten enthielten 50  $\mu\text{M}$  HEPES-Puffer pH 7,5 und 30  $\mu\text{Mole}$  D, L- $\beta$ -Hydroxybutyryl-N-Acetyl-Cysteamin. Der Start erfolgte durch Enzymzugabe in die Probeküvette, wobei in die Vergleichsküvette eine entsprechende Menge Rinderserumalbumin als Proteinlösung zugegeben wurde.
- (g) Malonyl-Transferase wurde unter Verwendung eines Doppelstrahlphotometers im optischen Test nach Weithmann (66) bestimmt, jedoch bei 235 nm bei einer Spaltbreite von 5 nm. Die Küvetten enthielten 50  $\mu\text{M}$  HEPES-Puffer pH 7,5, 60 nMole Malonyl-CoA, 10  $\mu\text{Mole}$  Acetylphosphat, 5 - 20  $\mu\text{g}$  FSS, dazu in der Probeküvette 10  $\mu\text{l}$  Phosphatransacetylase (1 mg/ml = 1000 E/mg), und in der Vergleichsküvette statt dessen 10  $\mu\text{l}$  Serumalbumin (1 mg/ml). Nach Beobachtung des Blindlaufes wurde durch Zugabe von 2  $\mu\text{Molen}$  N-Acetylcysteamin in Probe- und Vergleichsküvette die Reaktion gestartet.

Für die Thioester-Bande von Acetyl-CoA ist  
 $E_{233} = 4,44 \times 10^2 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \text{ mm}^{-1}$  (66).

- (h) Palmityl-Transferase wurde mit  $^{14}\text{C}$ -CoA-SH und Myristyl-CoA nach Schweizer (70) durchgeführt.

#### 14. Isolierung der Fettsäuresynthetase

Die Anreicherung der FSS erfolgte, wenn nicht anders angegeben, aus Wildtyp- und Mutantenhefe, ebenso aus Bier- und Bäckerhefe nach der Vorschrift von Lynen (53) modifiziert nach Oesterhelt (71), mit der einzigen Abänderung, daß bei der Ca-Phosphatgel-Adsorption die zu adsorbierende Proteinlösung mit Kalium-Phosphatpuffern pH 6,8 auf eine Konzentration von  $\text{m}/15$  eingestellt wurde. Dadurch befand sich nach der Abzentrifugation des Gels die Fettsäuresynthetase im Überstand und nicht adsorbiert an das Gel.

(i) Im späteren Verlauf der Arbeit wurden größere Hefemengen durch die weiter vorn beschriebene Methode des Einfrierens und Homogenisierens in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Nach dem Aufschluß wurde die Suspension 30 min bei  $16.500 \times g$  und  $4^\circ \text{C}$  zentrifugiert und der Überstand über Glaswolle filtriert. Zum Filtrat wurde Polymin P (25 ml pro Liter) zugegeben (72, 73). 10 % Polymin P (v/v) waren zuvor in  $\text{H}_2\text{O}$  mit konzentrierter HCl auf pH 6,0 eingestellt worden. Die mit Polymin P versetzte Enzymlösung wurde noch 10 min. heftig gerührt und anschließend 45 min bei  $16.500 \times g$  zentrifugiert.

Der Überstand wurde wieder über Glaswolle filtriert. Die angegebene Menge Polymix von 25 ml/100 ml Rohextrakt ist für Bierhefe ein Erfahrungswert, der die Menge an isolierbarer FSS in keinem Fall beeinträchtigte (vgl. Fig. 23).

(ii) Amoniumsulfat-Fraktionierung: pro 100 ml Proteinlösung wurden 19,4 g fein gepulvertes  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  zugegeben, dann noch 30 min gerührt und 30 min bei 16.500 x g zentrifugiert. (Der pH-Wert wird während der  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ -Zugabe mit 25 %  $\text{NH}_3$  bei pH 6,8 gehalten). Zum Überstand der I. Amoniumsulfat-Fällung wurden 8,7 g  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  / 100 ml zugegeben, 30 min weitergerührt und 30 min bei 16.500 x g zentrifugiert.

(iii) Ca-Phosphatgel-Behandlung: Der Niederschlag der 2. Amoniumsulfat-Fällung wurde in 150 ml 65 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen und in einem Protein : Gel-Verhältnis von 1 : 1 (g/g) unter Rühren mit Calcium-Phosphat-Gel (ca. 30 mg/ml) versetzt. Nach 10 min Rühren wurde bei 9.880 x g 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde auf  $10^{-3}$  M Mercaptoäthanol,  $10^{-3}$  M EDTA und  $10^{-5}$  M PMSF gebracht und mit ihm dann die geschilderte 2-stufige Amoniumsulfat-Fraktionierung wiederholt.

(iv) Ultrazentrifugation: Der resultierende Niederschlag wurde in 20 ml KDE-Puffer aufgenommen (0,1 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 6,5,  $10^{-3}$  M DTT,  $10^{-3}$  M EDTA) und 30 min bei 100.000 x g im 60 Ti-Rotor klarzentrifugiert. Zum Überstand wurden 50 µl PMSF-Lösung (s.o.) zugegeben und das Enzym

dann im 60 Ti-Rotor 12 h bei 100.000 x g sedimentiert. Der Niederschlag wurde in 25 ml KDE-Puffer aufgenommen, und bei 25.300 x g 20 min lang klarzentrifugiert. Der klare Überstand wurde nochmals 6 h bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

(v) Saccharose Dichtegradienten-Zentrifugation: Der Enzymniederschlag wurde in 8 ml KDE-Puffer aufgenommen, in 15 ml Corex-Zentrifugengläsern bei 25.300 x g für 20 min klarzentrifugiert und der Überstand auf 8 Saccharose-Gradienten 10-30 % (g/g) in KDE-Puffer verteilt. Die Gradienten wurden im TV 850 Vertikalrotor (Sorvall) bei 45.000 UpM 120 min oder im SW-27 Rotor (Beckmann) bei 23.000 UpM 15 h lang in 10-25 % (g/g) Rohrzucker-Gradienten zentrifugiert. Die Gradienten wurden danach ausgetropft (Fraktionsvolumen ca. 0,8 ml entspr. 25 - 30 Tropfen), die Extinktion jeder Fraktion bei 280 nm gemessen, die Spitzenfraktion vereinigt, mit KDE-Puffer verdünnt, und das in ihnen enthaltene Enzym während 12 h bei 100.000 x g in der Ultrazentrifuge sedimentiert. Der Niederschlag wurde in KDE-Puffer aufgenommen, das gleiche Volumen Glycerin (98 %) zugefügt und die FSS-Lösung bei -25° C aufbewahrt.

15. Beladung von Fettsäuresynthetase mit  $^{14}\text{C}$ -Acetyl- und  $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-Resten

---

(a) Reaktion mit I- $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA: Die Inkubation von Fettsäuresynthetase mit I- $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (sp. Aktivität  $1,3 \times 10^6$  bzw.  $40 \times 10^6$  IpM/ $\mu\text{Mol}$ ) und die daran anschließende oxidative

Spaltung von Acetyl-Thioester-Bindungen durch Perameisensäure erfolgte nach Schweizer (74, 81).

- (b) Reaktion mit I-<sup>14</sup>C Jodacetamid: die spezifische Markierung der peripheren SH-Gruppe ( $\alpha$ -Untereinheit) mit <sup>14</sup>C-Jodacetamid erfolgte nach der von Kresze angegebenen Methode (75).

#### 16. Dissoziation und präparative Trennung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$

Die Dissoziation des Fettsäuresynthetasekomplexes erfolgte grundsätzlich nach den von Wieland (27) angegebenen Bedingungen. Gereinigte FSS wurde in der Ultrazentrifuge 8 h bei 100.000 x g sedimentiert und der Niederschlag im Spaltpuffer (0,3 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, 10 mM 2-Mercapto-äthanol) mit einer Konzentration von 5,5 - 6,5 mg/ml aufgenommen. Das Volumen eines einzelnen Ansatzes war 1,0 ml. Unter Rühren (Eisbad) wurde Dimethylmaleinsäureanhydrid (13  $\mu$ l/ml Spaltansatz einer 0,8 M/Lösung in wasserfreiem THF bis zu einer Endkonzentration von 10 mM) zugegeben. Der Spaltansatz wurde 30 min bei 0° C inkubiert und dann auf eine Sephadex G 50 Säule (1 x 10, äquilibriert in 0,02 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5, 1 mM DTT) aufgetragen und mit dem Äquilibrierungspuffer eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und auf einen Rohrzuckergradienten aufgetragen (15 - 25 % (g/g) Rohrzucker im Äquilibrierungspuffer). Die Gradienten wurden 10 - 12 h bei

49.000 UpM im TV 850 Vertikalrotor bei 4° C zentrifugiert.

#### 17. Reassoziation der FSS-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$

Die Reassoziation der FSS-Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  zum intakten Komplex erfolge mit gewissen Abänderungen der von Wieland beschriebenen Methode. Da die durch präparative Rohrzuckerdichtegradienten getrennten FSS-Untereinheiten nicht mehr zum intakten Komplex reassoziieren (67) wurden Reassoziations-Experimente stets mit dem bei der Komplexspaltung erhaltenen Komponentengemisch durchgeführt.

Die Spaltung der FSS erfolgte wie zuvor beschrieben. Das Spaltgemisch wurde nach der Inkubation bei 0° C während 30 min, in 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0, 1 mM DTT umäquibriert (s.o.). Die Proteinlösung der vereinigten Sephadex G 50-Spitzenfraktionen wurde im Verhältnis 1 : 1 (v/v) mit 2 M Tris/Acetat-Puffer pH 8,1 verdünnt. In diesem Puffer waren 5 mg Rinderserumalbumin enthalten. Dieser Ansatz wurde dann durch Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung, welche mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konz. auf pH 2,0 eingestellt worden war, am pH-Meter auf pH 4,6 gebracht (Raumtemperatur). Danach wurde die Lösung 1 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und die Proteinfällung dann bei 20° C und 25.300 x g 20 min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Eisbad in 1,0 ml Reaktivierungspuffer (0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, 10 mM DTT, 0,5 mM K-EDTA und 20  $\mu$ M FMN) aufgenommen (76).

Der Ansatz wurde 90 min bei 25° C inkubiert und anschließend daraus die reaktivierte FSS durch Rohrzuckerdichtegradientenzentrifugation (150 min, 45.000 UpM) im Vertikalrotor abzentrifugiert (Zuckergradient 10 - 30 % (g/g) im Reaktivierungspuffer).

18. Bildung von Hybridkomplexen zur in vitro-Komplementation mutierter Fettsäuresynthetasen

Zwei aus verschiedenen fas-Mutanten isolierte hochgereinigte FSS-Präparationen wurden wie oben beschrieben zunächst einzeln mittels DMMA gespalten und dann zur gemeinsamen Reassoziaton vor der sauren Amoniumsulfatfällung (s.o.) im Proteinverhältnis (g/g) 1 : 1 gemischt. Die Isolierung des gebildeten Hybridkomplexes erfolgte wie für das homogene Enzym beschrieben.

19. Hefezellrohextrakt-Konzentrat

Für die Herstellung eines solchen Konzentrates wurde der Zellrohsaft, wie unter 10. und 12d beschrieben, hergestellt und klar zentrifugiert. Dieser Proteinlösung wurden Ammoniumsulfat (29,1 g / 100 ml) zugegeben und die entstandene Fällung 20 min bei 25.300 x g zentrifugiert (vgl. auch 14). Der Niederschlag wurde dann in wenig 0,1 M KDE-Puffer pH 7,4 gelöst und diese erhaltene Lösung noch 3 Stunden gegen diesen Puffer dialysiert. Alle Operationen wurden bei 4° C durchgeführt.

### III. ERGEBNISSE

#### A. Nachweis und biochemische Charakterisierung einiger neuartiger genetischer Defekte des Fettsäure-Synthetase-Systems der Hefe

---

##### 1. Nachweis von Acetyltransferase-Mutanten sowie biochemische Charakterisierung aller zur Verfügung stehenden Arten von fas1-Mutationen

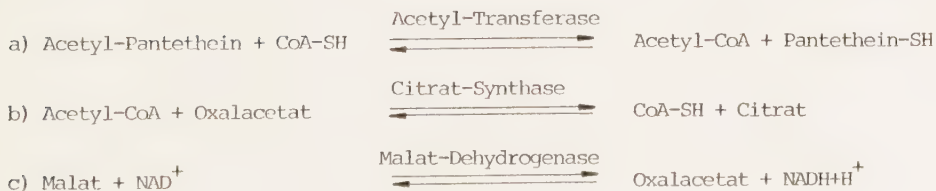
---

Im Vergleich zu früheren Untersuchungen dieser Art lagen zu Beginn dieser Arbeit wesentlich umfangreichere und detailliertere Komplementationsanalysen der Gene fas1 und fas2 vor. Diese erweiterten Komplementations-Karten enthielten auch eine Reihe bisher biochemisch noch nicht charakterisierter Mutanten-Gruppen. Es lag nahe, bei der Suche nach bisher noch nicht charakterisierten genetischen Defekten des FSS-Systems (z.B. Acetyltransferase und Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase) das Augenmerk besonders auf Vertreter solcher neuen Mutanten-Gruppen zu richten. Die Untersuchungen sollten gleichzeitig auch die bisher bekannten Gen-Enzym-Beziehungen im fas-System der Hefe überprüfen und erweitern.

Auf der Suche nach dem bisher noch nicht charak-

terisierten Acetyltransferase-Gen des FSS-Komplexes wurde zunächst untersucht, ob die Acetyltransferase-Aktivität entweder im Rohextrakt oder in einer nur grob gereinigten Enzymfraktion spezifisch nachzuweisen war. In einem solchen Fall wäre es möglich gewesen, ohne allzu großen Aufwand eine sehr große Zahl von Mutanten rasch durchzutesten. Als Testsystem entsprechend den Angaben von Weithmann (66) wurde die Acetyltransferase-abhängige Bildung von Acetyl-CoA aus Acetyl-Pantethein (Gl. 2a) und die daran anschließende Reaktion von Acetyl-CoA mit Oxalessigsäure zu Citronensäure (Gl. 2b) benutzt. Die letztgenannte Reaktion kann in einem gekoppelten Test mittels Malat-Dehydrogenase optisch verfolgt werden (Gl. 2c). Diese Testmethode macht sich die Tatsache zunutze, daß Citratsynthase zwar Acetyl-CoA, jedoch nicht Acetyl-Pantethein umsetzt (82).

## Gl. 2



Leider stellte sich heraus, daß der genannte Test für die Bestimmung der Acetyl-transferierenden FSS-Teilaktivität offenbar recht unspezifisch ist. In einer durch immunologische Analyse nachgewiesenermaßen FSS-freien fas-Mutante (fas1-84) war in allen untersuchten Zellfraktionen-Rohextrakt, 2. Ammoniumsulfat Niederschlag, 100.000 x g Niederschlag (vgl. Anreicherung der FSS in Material und Methoden) - eine gegenüber den entsprechenden Wildtyp-Fractionen unverminderte Aktivität festzustellen (Werte nicht aufgeführt). Offenbar kann also beim Nachweis dieser FSS-Teilaktivität nicht auf eine Enzymreinigung und auf einen Test des gereinigten Komplexes verzichtet werden. Es wurde daher die Reinigung und enzymatische Charakterisierung des markierten FSS-Komplexes aus einer beträchtlichen Zahl von fas1 Mutanten, besonders unter dem Gesichtspunkt der Entdeckung eines spezifischen Acetyltransferase-Defektes, unternommen. Die Auswahl der zu untersuchenden Mutanten erfolgte auf der Grundlage ihres bekannten genetischen Komplementationsverhaltens mit dem Ziel, möglichst von jeder Komplementationsgruppe mindestens einen Vertreter in die Untersuchung eingeschlossen zu haben.

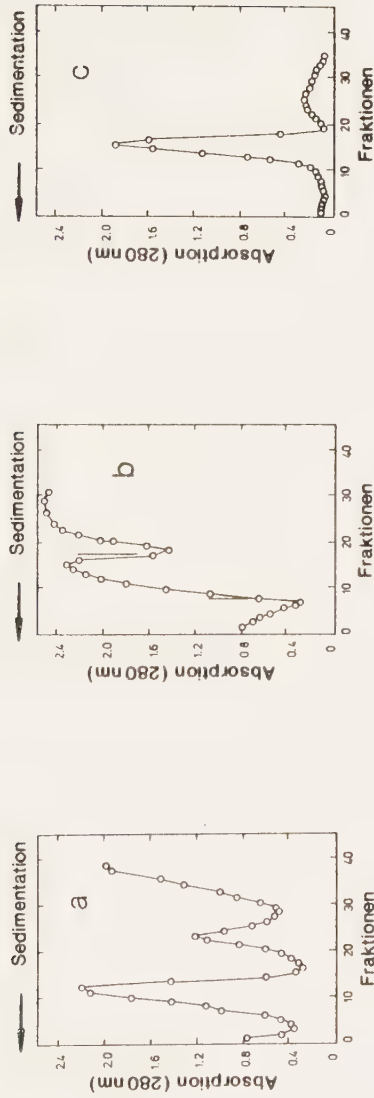


Fig. 4: Rohruckerdichtegradienten-Zentrifugation von Fettsäuresynthetase-Präparationen aus SC 9 (a) sowie aus fas1-1343 nach der ersten (b) und nach einer zweiten (c) Sedimentation.  
Experimentelle Einzelheiten zur Enzymreinigung und Rohruckerdichtegradienten-Zentrifugation (vgl. Material und Methoden)

Bei der Reinigung von verschiedenen Mutanten-FSS wurden ungefähr in der Hälfte aller Fälle bei der Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugationen Gradientenprofile erhalten, welche dem in Fig. 4a gezeigten Profil eines Wildtyp-Enzyms grundsätzlich gleichen. In den übrigen Fällen wurde die FSS jedoch nicht als eine einzelne diskrete Bande erhalten, sondern war lediglich als "Schulter" auf der kürzer welligen Seite eines größeren Verunreinigungs-"Berges" zu erkennen. (Fig. 4b). Durch Rezentrifugation der Spitzenfraktionen konnte jedoch auch hier schließlich ein reines Enzympräparat erhalten werden (Fig. 4c).

Alle in Tab. 1 enthaltenen Enzymaktivitäten wurden mit den Spitzenfraktionen der Rohrzuckerdichtegradienten-Zentrifugation hochgereinigter FSS-Präparationen gemessen. Es läßt sich, etwa durch SDS-Gelelektrophorese zeigen, daß derart gereinigte FSS-Präparationen frei von Fremdproteinen sind (83).

Die Ergebnisse der enzymatischen Charakterisierung des gereinigten Enzymkomplexes aus einer größeren Zahl verschiedener fas1-Mutanten sind in Tab.1 zusammengestellt.

Man sieht, daß bei den untersuchten Mutantenzymen der Verlust der Gesamtaktivität gewöhnlich auf die spezifische Inaktivierung nur einer einzigen Teilaktivität des Komplexes zurückgeht. Dabei sind, wie auch schon frühere Untersuchungen gezeigt haben (41), die verschiedenen Teilenzym-Defekte spezifisch für ganz bestimmte Komplementationsgruppen. In einigen Fällen werden allerdings neben dem eigentlichen Defekt, nämlich der Inaktivierung einer bestimmten Teilaktivität auch noch Veränderungen der spezifischen Aktivität anderer Teilenzyme des Komplexes beobachtet. Dabei kann es sich um eine Abnahme wie auch um eine Zunahme der Aktivität verglichen mit der entsprechenden Aktivität des Wildtyp-Enzymes handeln. Als Beispiel sei die (bis zu 10-fache) Aktivitätssteigerung der Kondensationsreaktion bei Enoyl-Reduktasedefekten Mutanten angeführt. Alle derartigen Abweichungen der Teilaktivitäten von Mutantenzymen von den entsprechenden Aktivitäten des Wildtyp-Enzyms waren signifikant höher als die durchschnittlichen Aktivitätsschwankungen, die beim Vergleich verschiedener Wildtypfettsäuresynthetase-Präparationen beobachtet wurden.

Als weiteres wichtiges Ergebnis dieser Untersuchungsreihe ergab sich, daß unter den untersuchten fas1-Mutanten tatsächlich solche mit einem eindeu-

Tab.1:

Teilenzym-Aktivitäten von gereinigten Fettsäuresynthetase-Präparationen  
aus Wildtyp- und fas1-Mutantenzenellen

Die Enoyl-Reduktase wurde mit dem Diaphorase-Test nach Seubert (78) bestimmt.  
Zu der Bestimmung der übrigen Teilaktivitäten vgl. Material und Methoden.

FSS = Fettsäuresynthetase-Gesamtreaktion, MAL = Malonyl-Transferase  
PAL = Palmityl-Transferase ACE = Acetyl-Transferase  
KON = Kondensierendes Enzym ( $\beta$ -Ketoacyl-Synthase),  
I.RED =  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase DEH = Dehydratase,  
ENR = Enoyl-Reduktase

| Stamm          | Kompl.<br>Gr. | Enzymaktivitäten |      |      |      |     |        |     |       |
|----------------|---------------|------------------|------|------|------|-----|--------|-----|-------|
|                |               | FSS              | MAL  | PAL  | ACE  | KON | I. RED | DEH | ENR   |
| m Einheiten/mg |               |                  |      |      |      |     |        |     |       |
| SC 167         | -             | 710              | 3400 | 1285 | 650  | 17  | 1760   | 13  | 6580  |
| fas1-1600      | II            | 5                | 3060 | 488  | 1300 | 153 | 1954   | 19  | 715   |
| fas1-2224      |               | 4                | 4726 | 617  | 1930 | 125 | 2270   | 38  | 263   |
| fas1-1923      |               | 5                | 2618 | 591  | 500  | 51  | 1760   | 17  | -     |
| fas1-2465      | Va            | 262              | 1054 | 848  | -    | 43  | 1883   | 19  | 8750  |
| fas1-1924      |               | 213              | 100  | 964  | -    | 29  | 1760   | 23  | 11515 |

|           |     |       |      |      |     |      |     |       |
|-----------|-----|-------|------|------|-----|------|-----|-------|
| fas1-1320 | 42  | 714   | 630  | 33   | 1   | 2130 | 17  | 3685  |
| fas1-2670 | 64  | 1020  | 244  | 5    | -   | 1760 | 111 | 658   |
| fas1- 83  | 14  | 1290  | 951  | -    | 19  | 1760 | 22  | 14800 |
| fas1-2586 | 3   | -     | 154  | -    | -   | 2060 | 3   | 2300  |
| fas1- 264 | 213 | 136   | 75   | 71   | 11  | 1173 | 4   | 724   |
| fas1- 185 | 14  | 714   | 138  | -    | 33  | 1760 | 32  | 11580 |
| fas1-2329 | 3   | 4250  | 8    | 1092 | 21  | 1360 | 15  | 2237  |
| fas1-1883 | 2   | 9248  | 6    | 3185 | -   | 1760 | 41  | 1523  |
| fas1-1447 | 22  | 2720  | 5    | 1970 | 12  | 1760 | 33  | 3487  |
| fas1-1099 | 3   | 612   | 6    | -    | 1   | 1760 | 10  | 15135 |
| fas1-2726 | 4   | 1800  | 77   | 683  | -   | 2376 | 26  | 10790 |
| fas1-1518 | 5   | -     | -    | 507  | 6   | 2112 | 9   | 10528 |
| fas1-1813 | 5   | -     | -    | 1320 | -   | 2210 | 18  | 6317  |
| fas1-2343 | 4   | 1120  | 154  | 806  | -   | 1092 | 18  | 1711  |
| fas1-2439 | 5   | 985   | 321  | 215  | 7   | 1197 | -   | 460   |
| fas1-1467 | 4   | 9585  | 2544 | 2372 | 32  | 2060 | -   | 5067  |
| fas1-2550 | 2   | 15062 | 231  | 2132 | 53  | 2280 | -   | 18687 |
| fas1-2449 | 2   | 6936  | 411  | 982  | 88  | 1936 | -   | 5132  |
| fas1-1218 | 28  | 3060  | 1038 | 2021 | 7   | 2210 | -   | 3835  |
| fas1-2653 | 3   | 3570  | 411  | 2048 | 16  | 2024 | -   | 855   |
| fas1-1928 | 5   | 10200 | 257  | 657  | 113 | 1600 | -   | 987   |

tigen und zum Teil auch spezifischen Acetyltransferase-Defekt waren. Der Übersichtlichkeit halber sollen die spezifischen Enzymdefekte der verschiedenen fas1-Komplementationsgruppen im folgenden, der Reihe nach geordnet, besprochen werden.

Komplementations-Gruppe II: Es ist bekannt, daß diese Gruppe einen spezifischen Defekt der Enoyl-Reduktase Teilaktivität besitzt (41). Beim Vergleich verschiedener Mutanten dieser Gruppe (Tab. 1) fällt auf, daß unter den übrigen Fettsäuresynthase-Teilaktivitäten drei, die Dehydratase, die Acetyl-Transferase und besonders die  $\beta$ -Ketoacyl-Synthetase, eine deutliche Aktivitätssteigerung gegenüber dem Wildtyp-Enzym aufweisen. Interessanter Weise liegen nur die Dehydratase und die Acetyl-Transferase auf der mutierten  $\beta$ -Untereinheit, während die  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase auf der (genetisch intakten !)  $\alpha$ -Untereinheit lokalisiert ist. Daneben beobachtet man in allen Mutanten auch eine um ca. 50 Prozent reduzierte Palmityltransferase-Aktivität. Der gewöhnlich bei Palmityltransferase-Schädigungen festgestellte gleichzeitige Ausfall der Malonyl-Transferase des Komplexes (s.u.) wird hier nicht beobachtet.

Komplementations-Gruppe Va: Nach den in Tab. 1 aufgeführten Daten handelt es sich bei der Gruppe

Va offensichtlich um Acetyl-Transferase defekte Mutanten. Dabei fällt auf, daß gelegentlich trotz des völligen Verlustes der Acetyltransferase-Teilaktivität die Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität noch bis zu einem Umfang von 30 Prozent der Wildtyp-Aktivität erhalten geblieben war. Diese Erhaltung der Gesamtaktivität ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, daß ein ungewöhnlich großer Teil dieser Mutanten auf Fettsäure-freien Nährböden (YEP-Agar) noch ein schwaches Restwachstum zeigt ("leaky"-Charakter). Bei allen Acetyl-Transferase Mutanten beobachtet man gleichzeitig auch eine Beeinträchtigung der Malonyl- und Palmityl-Transferase Teilaktivitäten (vgl. auch Gruppe Vb). Als Folge davon kann bei diesen Mutanten die Kondensationsreaktion (  $\alpha$ -Untereinheit ! ) nicht aktiv sein, was man tatsächlich auch findet.

Weiterhin fällt beim Vergleich der verschiedenen Gruppe Va-Mutantenenzymen auf, daß unter den restlichen Teilaktivitäten die Enoyl-Reduktase und die Dehydratase sehr starken Aktivitätsschwankungen unterliegen.

Gruppe Vb: Durch die Untersuchungen von Knobling (68) war die Komplementationsgruppe Vb mit spezifi-

schen Malonyl- und Palmityl-Transferasedefekten korreliert worden. Dabei bestätigte sich erwartungsgemäß, daß beim Ausfall der Malonyltransferase-Aktivität stets die  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase Aktivität ebenfalls ausfiel, obwohl sie, verglichen mit den Acyltransferasen auf der anderen Unter-einheit ( $\alpha$ ) lokalisiert ist. Diese Ergebnisse waren seinerzeit an Hand des Einbaus von  $^{14}\text{CO}_2$  in Malonat (= Rückreaktion) erhalten worden. In dieser Arbeit dagegen wurde die  $\beta$ -Ketoacylsynthase-Aktivität über die Triacetolactonbildung verfolgt. Beide Meßmethoden führten offensichtlich zum gleichen Ergebnis. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen postulierte Engeser (84, 87), daß die aktiven Zentren von Malonyl- und Palmityl-Transferase zumindest partiell identisch sind, und daß ein und dieselbe Serin OH-Gruppe als Akzeptor für beide Acylreste dienen kann. Es ist nicht anzunehmen, daß für zwei chemisch so verschiedene Substrate wie die stark polare Malonsäure und die apolare Palmitinsäure vollständig identische Bindungsregionen am Enzymprotein vorliegen. Daß diesbezügliche Unterschiede, trotz identischer Anknüpfungsstelle, tatsächlich existieren, wird durch die Beobachtung gestützt, daß auch einige Mutanten gefunden wurden, in denen nur eine der beiden Acyltransferasen spe-

zifisch geschädigt war. So haben z.B. die Mutanten fas1-2329, fas1-1883 und fas1-1447 keine Palmityltransferase-Aktivität, besitzen jedoch eine völlig intakte Malonyltransferase-Aktivität. Als Folge hiervon tritt in diesen Mutanten auch kein Verlust der  $\beta$ -Ketoacylsynthase-Aktivität auf. Lediglich Mutante fas1-1883 bildet in dieser Richtung eine Ausnahme. Der Grund hierfür ist vorläufig unklar. Die nicht direkt geschädigten übrigen Teilaktivitäten schwanken in Gruppe Vb in ihrer spezifischen Aktivität untereinander stärker, als dies üblicherweise zwischen unabhängig voneinander isolierten Fettsäuresynthetase-Präparationen der Fall ist (Tab. 1).

Komplementations-Gruppe Vc: Auch von dieser Gruppe war schon länger bekannt, daß es sich hierbei um Dehydratase-defekte Mutanten handelt. Einheitlich waren bei den meisten untersuchten Mutantenzymen dieser Gruppe alle intakt gebliebenen Fettsäuresynthetase-Teilaktivitäten gegenüber dem Wildtypenzym leicht, jedoch signifikant, erhöht.

Neben diesen großen fas1-Komplementationsgruppen treten noch eine Reihe von kleineren Gruppen mit oft nur einem einzigen Vertreter auf. Diese Mutan-

ten zeigten jedoch kein neuartiges Defektmuster. In manchen Fällen (z.B. fas1-185, fas1-1218, fas1-2653, fas1-1928) mag es sich auch um Doppelmutanten handeln. Genetische Daten hierzu liegen jedoch nicht vor.

Hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang auch einige Vertreter der Gruppe II, welche mit drei Vertretern der Gruppe Vc (1-1860, 1-1467, 1-1218) nicht, bzw. schlecht komplementierten (vgl. Fig.3). Die gereinigten Fettsäuresynthetasen dieser Mutanten wurden in Zusammenarbeit mit R. Johnston untersucht. Wie weiter hinten in dieser Arbeit in anderem Zusammenhang geschildert werden wird, zeigte sich, daß die Ursache für dieses negative Komplementationsverhalten zwischen Vertretern zweier verschiedener Komplementationsgruppen offenbar in einer gleichzeitigen Schwächung der beiden für die betreffenden Komplementationsgruppen charakteristischen Teilaktivitäten lag (vgl. Tab. 10).

2.  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Beladung des Acetyltransferase-defekten  
Fettsäuresynthetase-Komplexes der Mutante fas1-1320

Nach der enzymischen Identifizierung von Acetyltransferase-defekten fas1-Mutanten wurde versucht, den Ausfall dieser Teilaktivität in der Gruppe Va auch dadurch nachzuweisen, daß es nicht mehr möglich war, die Acetylbindungsstellen eines solchen Fettsäuresynthetase-Komplexes mit Acetylgruppen zu beladen. Bekanntlich wird nach den Lynen'schen Modellvorstellungen Acetat an 3 verschiedenen Bindungsstellen der Fettsäuresynthetase gebunden: an die OH-Gruppe der Acetyl-Transferase, an die zentrale SH-Gruppe des "Acyl Carrier Proteins" und an die periphere SH-Gruppe der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase (vgl. Fig. 5). Anhand ihrer Empfindlichkeit gegenüber Perameisensäure-Oxidation kann zwischen esterartiger- und thioesterartiger Acetylbindung unterschieden werden (88). Falls die Acetyl-Transferase defekt ist, sollten alle 3 Acetat-Bindungsstellen nicht mehr besetzt werden. Leider konnte dies mit der von uns untersuchten Mutante nicht bestätigt werden.

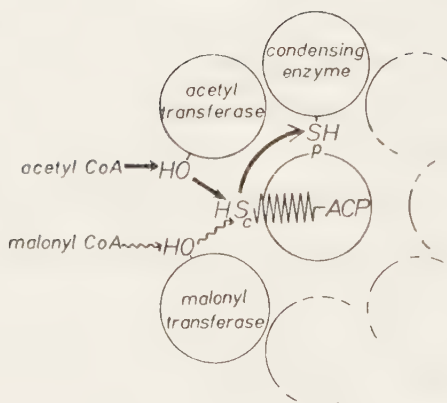


Fig. 5: Acetyl- und Malonyl-Bindungsstellen der Fettsäuresynthetase, sowie mögliche Transacetylase-Reaktionen für Acetat (gerade Pfeile) und Malonat (gewellte Pfeile) (89).

ACP = Acyl carrier protein,  
 SH<sub>p</sub> = periphere SH-Gruppe,  
 SH<sub>c</sub> = zentrale SH-Gruppe

Tab. 2: Bildung und oxidative Spaltung von  $^{14}\text{C}$ -  
Acetylenzym bei Wildtyp- und fas1-1320  
Fettsäuresynthetase

Je 1 mg Fettsäuresynthetase wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 und 0,25  $\mu\text{M}$  I- $^{14}\text{C}$ -Acetyl-CoA (sp. Aktivität  $40 \times 10^6$   $\text{IpM}/\mu\text{Mol}$ ) in einem Volumen von 0,5 ml 5 Minuten bei  $0^\circ\text{C}$  inkubiert. Dann wurden 3 ml konzentrierte Ameisensäure zugegeben und die Lösung in zwei gleiche Teile geteilt. Der eine Teil wurde ohne weiteren Zusatz, der andere nach Zugabe von 0,5 ml 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  über Nacht bei  $40^\circ\text{C}$  inkubiert. Beide Proben wurden dann mit Wasser auf das doppelte Volumen verdünnt und das Protein mit 2 ml 3 M Trichloressigsäure ausgefällt. Die Proteinfällung der Proben wurde 10 min bei  $2.500 \times g$  zentrifugiert und der Niederschlag 4 Mal mit je 5 ml 0,05 M Trichloressigsäurelösung gewaschen, der verbliebene Rückstand in 0,5 ml konzentrierter Ameisensäure gelöst und schließlich mit insgesamt 15 ml Dioxanzählflüssigkeit in ein Zählgläschen gespült und die Radioaktivität bestimmt.

| Ansatz                                                                 | Proteingebundenes<br>$^{14}\text{C}$ -Acetat |     |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|-----|
| a) <u>Wildtyp</u> :                                                    | IpM                                          | %   |
| $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym + $\text{HCOOH}$                          | 26900                                        | 100 |
| $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym + $\text{HCOOH}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ | 11900                                        | 44  |
| b) <u>fas1-1320</u> :                                                  |                                              |     |
| $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym + $\text{HCOOH}$                          | 12800                                        | 100 |
| $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym + $\text{HCOOH}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ | 7530                                         | 59  |

Wie Tab. 2 zeigt, besteht zwischen Wildtyp- und Mutanten-Fettsäuresynthetase überraschenderweise keinerlei Unterschied hinsichtlich Art und Umfang der Acetylenzym-Bildung. Dies mag einmal durch eine Unspezifität der anderen, in dieser Mutante noch aktiven Transferasen bedingt sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die geringe bei dem untersuchten Enzym noch vorhandene Acetyltransferase-Aktivität (vgl. Tab. 1) ausgereicht hat, in Anwesenheit der extrem hohen angewandten Substratkonzentration sowie innerhalb des relativ langen Beladungszeitraumes die Acetylbindungsstellen zwar langsamer als normal, aber schließlich doch vollständig zu beladen. Eine nochmalige, kinetisch verfeinerte Untersuchung der Beladungsreaktion müßte diese Frage klären.

### 3. Ungewöhnliches Flavin-Spektrum der Mutante *fas1-1923*

Der intakte Fettsäuresynthetase-Komplex ( $\alpha_6 \beta_6$ ) der Hefe enthält 5 - 6 Mole nicht-kovalent gebundenes Flavin-Mononukleotid (90). Dieses läßt sich, etwa durch saure Ammonsulfat- und erst recht durch Trichloressigsäurefällung des Enzyms, normalerweise leicht vom Enzymprotein abtrennen (91). Unter allen

im hiesigen Institut untersuchten fas-Mutanten waren bisher - selbst bei inaktiver Enoyl-Reduktaseaktivität - keine Mutantenzymen mit einem qualitativ oder quantitativ veränderten Flavin-Gehalt beobachtet worden. Im Verlauf der hier durchgeführten enzymchemischen Charakterisierung einer großen Zahl verschiedenartiger fas1-Mutanten fiel die Enoylreduktase-Mutante fas1-1923 durch die ungewöhnlich intensive Gelbfärbung der hochgereinigten Mutantensynthetase auf. Eine vergleichbare Enzymkonzentration von Wildtypsynthetase besaß für das Auge eine wesentlich schwächer ausgeprägte Gelbfärbung. Es wurde daher außer der enzymatischen auch eine spektrale Charakterisierung dieser fas-Mutante durchgeführt.

Fig. 6 ist zu entnehmen, daß das Flavinspektrum der Wildtyp-Synthetase sehr stark dem Spektrum von freiem FMN gleicht und sich davon nur durch eine geringfügige Verschiebung der beiden Absorptionsmaxima zu tieferen Wellenlängen beim ersten Gipfel bzw. zu höheren beim zweiten unterscheidet. Eine ähnliche Rotverschiebung wurde schon von Warburg beim sog. "Alten gelben Ferment" beobachtet (92). Eine große Zahl gereinigter Mutanten-Pettsäuresynthetasen aus den verschiedensten fas1- und

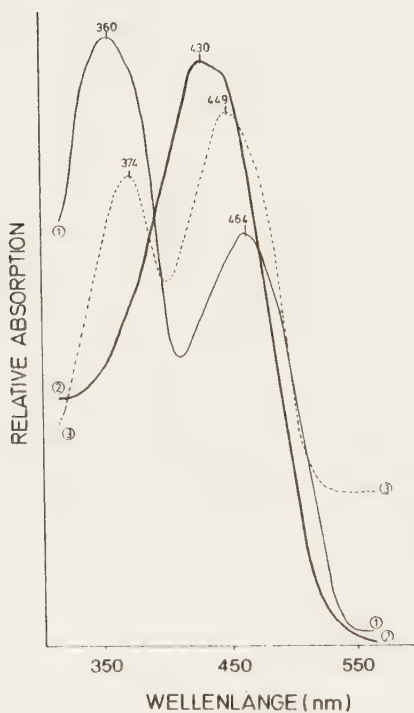


Fig. 6: Absorptionsspektren von FMN (3) sowie von ge-  
reinigter Fettsäure-Synthetase aus Wildtyp-(1)  
und fas1-1923 - (2) Zellen

Die Enzyme ebenso wie freies FMN waren in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6,5, 1 mM DTT und 1 mM EDTA gelöst.

fas2-Mutanten waren vom Wildtypenzym spektral nicht zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu besitzt jedoch die Mutante fas1-1923 ein drastisch verändertes Flavin-Absorptionsspektrum (vgl. Fig. 6). Anstelle der beiden Absorptionsmaxima bei 360 und 464 nm tritt hier nur noch eines auf und zwar, bei einer ungefähr in der Mitte zwischen den beiden ursprünglichen Absorptionsbanden liegenden Wellenlänge (430 nm). Daß es sich bei dem in Fig. 6 dargestellten Spektrum dieser Mutante immer noch um ein Flavin-Spektrum handeln muß, geht aus Fig. 7 und 8 deutlich hervor: Abgesehen von den Unterschieden in der Intensität sind die Anregungs- und Emmisionsspektren vom Wildtyp und fas1-1923 Synthetase qualitativ gleichartig.

Nach grober Schätzung und ohne Berücksichtigung des Quenchverhaltens, zeigt die Mutante fas1-1923 auf Grund der Fluoreszenzspektren einen Gehalt von 1 Mol "normal" gebundenem Flavin pro Mol Fettsäuresynthetase, an (93). Das bedeutet, daß dieses Mutantenzym nur etwa 1/5- 1/6 des normalen FMN-Gehaltes aufweist. Nach Trichloressigsäurefällung war dieses Enzym jedoch im Gegensatz zum Wildtypenzym noch stark gelb gefärbt, das charakteristische Flavin-Fluoreszenzspektrum ließ sich jedoch

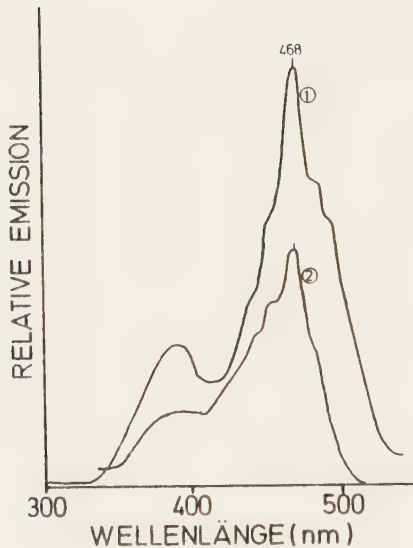


Fig. 7: Anregungsspektrum von nativer Fettsäure-  
synthetase aus Wildtyp (1) und von 1-1923  
Zellen (2) sowie von Trichloressigsäure-  
gefällter fas1-1923 Fettsäuresynthetase (3).

Die Enzymkonzentrationen von Wildtyp- und fas1-1923-Fettsäuresynthetase waren 4 mg/ml. 1 ml der Enzymlösung von fas1-1923 wurden 0,3 ml 50 % TCA zugefügt und der entstandene Niederschlag 5 min bei 2.500 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 ml konzentrierter Ameisensäure aufgenommen (3).

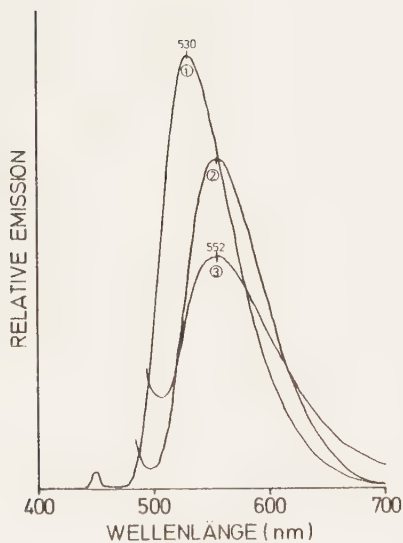


Fig. 8: Emissionsspektrum von Fettsäuresynthetase  
aus Wildtyp (2), aus fas1-1923 (3) sowie  
von freiem FMN (1).

Wildtyp (2) und fas1-1923 Fettsäuresynthetase (3) wurden bei 468 nm FMN (1) bei 445 nm angeregt. Der Puffer war 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5.

nicht mehr nachweisen (Fig. 7). Man muß daher annehmen, daß das restliche Flavin in dem Mutantenzym einmal kovalent an das Enzymprotein gebunden vorliegt, und möglicherweise auch noch zusätzlich chemisch modifiziert wurde. Natürlich vorkommende oder auch künstlich induzierte kovalente Bindung von Flavin-Kofaktoren an das Apoenzym sind bekannt. Auch das Auftreten von Absorptionsspektren mit nur 1 statt 2 Absorptionsmaxima ist in der Literatur beschrieben worden, etwa bei bestimmten Flavin-analogen Inhibitoren oder bei 8-Mercaptoflavinen (94, 95). Weiterhin ist bekannt, daß reduzierte Flavine keine Fluoreszenz mehr aufweisen (96). Welche dieser Möglichkeiten im vorliegenden Fall in Betracht kommen, muß vorerst offen bleiben.

Schließlich sei noch erwähnt, daß das Absorptionsmaximum der fas1-1923-Synthetase sich von 430 nm bei einem frisch isolierten Enzym durch Stehenlassen in den Fraktionen des Rohrzuckergradientens bei 4<sup>0</sup> C langsam bis zu einem Endwert von 400 nm verschiebt (vgl. Fig. 9). Dieser Endwert kann auch sofort erreicht werden, wenn man von dem in Ameisensäure aufgelösten Niederschlag der TCA-Denaturierung des Mutantenzym ein Spektrum aufnimmt (identisch mit Nr. 4 in Fig. 5).



Fig. 9: Absorptionsspektren von verschieden lange  
gelagerten Proben gereinigter fas1-1923  
FSS

Die Lagerung erfolgte bei 4° C in 0,1 M  
Kaliumphosphatpuffer pH 6,5, 1 mM DTT,  
1 mM EDTA.

1 = frisch isoliert, 2 und 3 = 24 h gela-  
geretes Enzym.

4 = 7 Tage

#### 4. Nachweis und Charakterisierung von Pantethein- freien fas-Mutanten

---

##### (a) Immunpräzipitation von $^{14}\text{C}$ -markierter Fett- säuresynthetase aus fas-Mutanten

---

Wie schon weiter vorne erwähnt, war ein Ziel dieser Arbeit die Suche nach Fettsäuresynthetase-Mutanten mit bisher nicht charakterisierten biochemischen Defekten. So waren, außer den schon besprochenen Acetyltransferase-Mutanten, bisher auch keine Mutanten des Enzyms Phosphopantethein-ACP-Ligase nachgewiesen worden. Dieses Enzym sollte, in Analogie zum bakteriellen "Acyl-Carrier Protein" (97) die prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein auf das Fettsäuresynthetase-Apoprotein übertragen. Als Folge eines entsprechenden genetischen Defektes sollte in den betreffenden Mutanten eine Phosphopantethein-freie Fettsäuresynthetase produziert werden. Mutanten der letztgenannten Art sind schon seit längerem bekannt (98). Es wurde bisher nicht geklärt, welche der beiden denkbaren Ursachen für den Defekt wirklich verantwortlich ist: eine defekte Ligase oder ein zur Aufnahme von Phosphopantethein nicht mehr befähigtes "Acyl-Carrier Protein". In jedem Fall stand der Nachweis von Mutanten der jeweils anderen Funktion noch aus.

Für die Anwesenheit bzw. Funktionsfähigkeit des "Acyl-Carrier Proteins" im Fettsäuresynthetase Komplex existiert bisher, vor allem im Rohextrakt, kein enzymatischer Test. Die Anwesenheit der prosthetischen Gruppe im Einzelkomplex wurde bisher stets durch den in vivo Einbau von radioaktiver Pantothenensäure in den Komplex nachgewiesen (99). Dieser Nachweis setzt normalerweise ein hochgereinigtes Enzym voraus. Deshalb kommt er für die Reihenuntersuchung einer großen Zahl von fas-Mutanten nicht in Frage. Es wurde daher versucht, auf der Grundlage des Einbaus radioaktiver Pantothenensäure in den Fettsäuresynthetase-Komplex einen empfindlichen immunologischen Test zu entwickeln, der es erlaubt, schon im Rohextrakt von Mutanten die Anwesenheit einer  $^{14}\text{C}$ -Pantothenensäure-markierten Fettsäuresynthetase nachzuweisen (85).

Zu diesem Zweck wurde, nach Anzucht der zu untersuchenden fas-Mutanten in  $^{14}\text{C}$ -Pantothenensäuremarkiertem Minimalmedium, zu einem Aliquot des Rohextraktes der geernteten und aufgeschlossenen Hefezellen, eine berechnete Menge an Fettsäuresynthetase-Antiserum zugegeben. Der Berechnung lag die Annahme zugrunde, daß der Anreicherungsfaktor der Fettsäuresynthetase aus dem Hefe-Rohextrakt 200 ist (53). Damit und mit

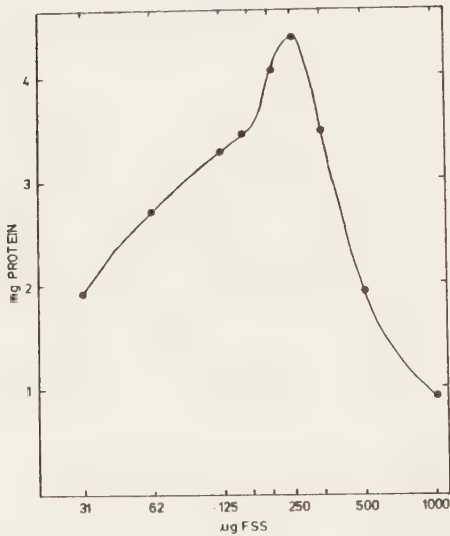


Fig. 10: Immun-Präzipitationskurve von Fettsäuresynthetase nach Heidelberger (50)

Unterschiedliche Mengen Fettsäuresynthetase wurde mit jeweils 0,5 ml verdünntem Kaninchen-Antiserum (1:16) im Reaktionsvolumen von 1 ml versetzt und nach 12 Stunden Inkubation bei 20° C der Proteingehalt des gebildeten Präzipitats bestimmt. Weitere experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methoden.

der Kenntnis der entsprechenden Heidelberger-Kurve (vgl. Fig. 10) war es möglich, die Menge einzusetzendes Antiserum so zu wählen, daß eine möglichst vollständige Immunpräzipitatbildung erzielt wurde. Dabei zeigte sich, daß die Filtriertechnik für so geringe Mengen Fettsäuresynthetase wie sie im Rohextrakt normalerweise vorliegen, (ca. 100  $\mu$ g/ml) ungeeignet ist: die radioaktive Markierung des Enzyms ist so niedrig, daß die für eine verläßliche Auszählung notwendigen Mengen Immunpräzipitat das Filter verstopfen und somit nicht mehr in ausreichender Weise von den vergleichsweise beträchtlichen Mengen unspezifisch anhaftender radioaktiver Markierung freigewaschen werden können. Die erhaltenen Meßwerte sind somit der eingesetzten Proteinmenge nicht mehr proportional.

Gut reproduzierbare Werte wurden jedoch erhalten, wenn das Immunpräzipitat (i) nicht durch Filtration sondern durch Zentrifugation und (ii) nicht als einfacher Antigen-Antikörper Komplex, sondern durch die Doppelantikörpermethode (100) unter zusätzlicher Verwendung von käuflichen Ziegen-Antikörpern gegen Kaninchen-Immunglobuline durchgeführt wurde. Hierbei ist die Bildung voluminöser Niederschläge kein Nachteil, sondern eher erwünscht.

Aus diesem Grund, und um eine möglichst vollständige Ausfällung der unter Umständen unterschiedlich konzentrierten  $^{14}\text{C}$ -markierten Fettsäuresynthetase in den verschiedenen Mutanten-Extrakten zu gewährleisten, wurde zu jedem Zellextrakt vor der Antikörperzugabe noch eine überschüssige und konstante Menge unmarkierter Fettsäuresynthetase als Träger zugesetzt. Alle Proben konnten dann mit derselben Menge Ziegen-Antikörper gegen Kaninchen IgG behandelt werden, ohne daß man befürchten mußte, daß in den verschiedenen Proben unterschiedliche Mengen löslicher Antigen (Fettsäuresynthetase)-Antikörper-Komplexe unerfaßt blieben. Tab. 3 und 4 enthalten die Ergebnisse, die mit der geschilderten Doppelantigenmethode bei einer großen Zahl verschiedener fas1 und vor allem fas2-Mutanten erhalten wurden. Man sieht, daß im Rohextrakt aller untersuchten fas1-Mutanten radioaktiv markiertes Fettsäuresynthetase-Protein vorhanden war. Dies steht im Einklang mit früheren Versuchen (101). Von den untersuchten fas2-Mutanten zeigten erwartungsgemäß nahezu alle Mutanten der Komplementationsgruppe VII keinen nennenswerten  $^{14}\text{C}$ -Pantothenensäure-Gehalt im Immunpräzipitat. Diese Gruppe von fas2-Mutanten synthetisiert be-

Tab. 3: <sup>14</sup>C-Pantothensäure-Einbau in fas1-Mutanten

Für die Berechnung des FSS-Gehaltes im Zellextrakt wurde der von Lynen angegebene Anreicherungsfaktor 200 zugrunde gelegt (53).  
Exp. Einzelheiten vgl. Material und Methoden

| Komplementations-<br>Gruppe | f <sub>as</sub> -Mutanten<br>Nr. | Proteingehalt<br>mg/ml | Angenommener<br>Fettsäuresynthe-<br>tase-Gehalt<br>µg/ml | <sup>14</sup> C-Gehalt des<br>Immunpräzipitats<br>IpM/100 µg FSS | <sup>14</sup> C-Gehalt der<br>TCA-Fällung | Reaktion im Ouch-<br>terlony-Doppeldi-<br>fusionsstest | Zusätzlich zum<br>Minimalmedium |
|-----------------------------|----------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------------------------|
| II                          | 1610                             | 19,65                  | 98,25                                                    | 645                                                              | 1050                                      | +                                                      | Adenin                          |
|                             | 2224                             | 36,9                   | 184,5                                                    | 460                                                              | 560                                       | +                                                      | Adenin                          |
|                             | 1923                             | 28,0                   | 140                                                      | 700                                                              | 1500                                      | +                                                      | Adenin                          |
| Va                          | 2465                             | 24,3                   | 121,5                                                    | 650                                                              | 630                                       | +                                                      | Adenin                          |
|                             | 1924                             | 30,6                   | 153                                                      | 590                                                              | 1300                                      | +                                                      | Adenin                          |

|              |      |       |        |      |      |   |                 |
|--------------|------|-------|--------|------|------|---|-----------------|
|              | 1320 | 26,0  | 130    | 780  | 1250 | + | Adenin          |
|              | 2670 | 19,0  | 95     | 740  | 950  | + | Adenin          |
|              | 83   | 59,4  | 297    | 1600 | 1850 | + | Histidin        |
|              | 2586 | 21,5  | 108    | 500  | 700  | + | Adenin          |
|              | 264  | 108   | 504    | 1400 | 1800 | + | Histidin        |
| Vb           | 2329 | 22,5  | 112,5  | 510  | 580  | + | Adenin          |
|              | 1883 | 26,0  | 130    | 780  | 860  | + | Adenin          |
|              | 1447 | 29,4  | 147    | 1290 | 1210 | + | Adenin          |
|              | 1099 | 19,5  | 97,5   | 740  | 650  | + | Adenin          |
|              | 2726 | 26,0  | 130    | 1290 | 1630 | + | Adenin          |
|              | 1518 | 22,5  | 112,5  | 760  | 750  | + | Adenin          |
|              | 1813 | 28,5  | 144    | 740  | 1200 | + | Adenin          |
|              | 2343 | 25,65 | 128    | 2100 | 2100 | + | Adenin          |
|              |      |       |        |      |      |   |                 |
|              | 2439 | 26,0  | 130    | 790  | 860  | + | Adenin          |
|              | 1467 | 41,5  | 208    | 600  | 710  | + | Adenin/Threonin |
|              | 2550 | 19,0  | 95     | 720  | 900  | + | Adenin          |
| Vc/II/<br>Vb | 2449 | 36,9  | 184,5  | 750  | 560  | + | Adenin          |
|              |      |       |        |      |      |   |                 |
|              | 2653 | 26,0  | 130    | 790  | 630  | + | Adenin          |
|              | 1928 | 26,4  | 132    | 670  | 970  | + | Adenin          |
| Vc/Vb        | 1218 | 34,35 | 171,75 | 600  | 1080 | + | Adenin          |



Tab. 4: <sup>14</sup>C-Pantothenensäure-Einbau in fas2-Mutanten

Experimentelle Einzelheiten vgl. Material und Methode bzw. Tab. 3. Eine nachträglich durchgeführte Kontroll-Komplementation ergab, daß die Mutante fas2-2855 der Komplementations-Gruppe VI und fas2-1557 der Komplementations-Gruppe VIII zugeordnet werden müssen (+), vgl. auch Tab. 6.

| Komplementations-Gruppe | Nr. fas-Mutanten | Protein-gehalt | mg/ml | Angenommener Fettsäuresynthetase-gehalt | <sup>14</sup> C-Gehalt des Immunpräzipitats | IpM/100 µg FSS | <sup>14</sup> C-Gehalt der TCA-Fällung | Reaktion im Ouchterlony Doppel-diffusionstest | Zusätzlich zum Medium |
|-------------------------|------------------|----------------|-------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|----------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------|
| SC                      | 167              | 55,56          | 275   | 275                                     | 1200-1400                                   | 1400           | 1400                                   | +                                             | Adenin                |
| VII                     | 158 alt          | 45,0           | 225   | 225                                     | 200                                         | 250            | 250                                    | +                                             | Histidin              |
| IV                      | 1539             | 43,0           | 215   | 215                                     | 200                                         | 250            | 250                                    | negativ                                       | Adenin                |
| VIIa +                  | 2855             | 32,5           | 163   | 163                                     | 650                                         | 1800           | 1800                                   | +                                             | Adenin (+)            |
| + 1887                  | 34,35            | 172            | 172   | 1000                                    | 1000                                        | 1000           | 1000                                   | +                                             | Adenin                |
| 1803                    | 29,4             | 147            | 147   | 170                                     | 210                                         | 210            | 210                                    | +                                             | Adenin                |
| + 1557                  | 74,5             | 373            | 373   | 1100                                    | 1200                                        | 1200           | 1200                                   | +                                             | Adenin (+)            |
| 1139                    | 11,25            | 2625           | 2625  | 600                                     | 900                                         | 900            | 900                                    | +                                             | Adenin                |

|      |   |         |       |       |      |      |   |          |
|------|---|---------|-------|-------|------|------|---|----------|
| VIIb | + | 1245    | 24,0  | 120   | 250  | 1000 | + | Adenin   |
|      | + | 1322    | 18,6  | 93    | 200  | 300  | + | Adenin   |
|      |   | 1593    | 35,75 | 179   | 600  | 650  | + | Adenin   |
|      |   | 2248    | 26,1  | 130   | 210  | 1240 | + | Adenin   |
|      |   | 1645    | 65,0  | 325   | 420  | 450  | + | Adenin   |
| VIIc | + | 1778    | 73,6  | 368   | 1250 | 1300 | + | Adenin   |
|      | + | 1645    | 40,5  | 203   | 450  | 1350 | + | Adenin   |
|      | + | 2311    | 53,0  | 266   | 250  | 1000 | + | Adenin   |
|      |   | 2093    | 85    | 424,5 | 1100 | 1000 | + | Adenin   |
|      |   |         |       |       |      |      |   |          |
| IV   |   | 1561    | 67    | 334   | 1450 | 1100 | + | Adenin   |
|      |   | 1973    | 85    | 425   | 450  | 200  | + | Histidin |
|      |   | 1740    | 91,65 | 450   | 250  | 300  | + | Adenin   |
|      | + | 2537    | 70,8  | 354   | 380  | 2100 | + | Adenin   |
|      |   |         |       |       |      |      |   |          |
| IX   | + | 1373    | 49,0  | 244,5 | 400  | 600  | + | Adenin   |
|      |   | 2054    | 62,0  | 310   | 1400 | 1100 | + | Adenin   |
|      |   |         |       |       |      |      |   |          |
| VI   |   | 150 alt | 115   | 575   | 1300 | 1400 | + | Histidin |
|      |   | 1898    | 124   | 620   | 900  | 900  | + | Adenin   |
|      |   | 1832    | 64    | 320   | 500  | 1100 | + | Adenin   |
|      |   | 1124    | 59,5  | 298   | 500  | 1550 | + | Adenin   |
|      |   | 1268    | 40    | 200   | 850  | 800  | + | Adenin   |
|      |   | 1365    | 112   | 560   | 1100 | 1000 | + | Adenin   |
|      |   | 1114    | 44    | 220   | 500  | 700  | + | Adenin   |
|      |   |         |       |       |      |      |   |          |
|      |   |         |       |       |      |      |   |          |

|      |       |     |      |      |         |                 |
|------|-------|-----|------|------|---------|-----------------|
| 515  | 93    | 465 | 750  | 800  | +       | Histidin        |
| 2013 | 60    | 300 | 1200 | 1000 | +       | Adenin          |
| 1347 | 61,35 | 306 | 1600 | 1700 | +       | Adenin/Threonin |
| 1655 | 68    | 338 | 900  | 850  | +       | Adenin          |
| 1925 | 49    | 245 | 800  | 1850 | +       | Adenin          |
| 2507 | 61    | 305 | 1000 | 1100 | +       | Adenin          |
| VI   |       |     |      |      |         |                 |
| 1004 | 113   | 556 | 1500 | 1600 | +       | Adenin/Histidin |
| 1371 | 69    | 345 | 800  | 700  | +       | Adenin          |
| 2225 | 60    | 300 | 1450 | 1400 | +       | Adenin          |
| 1652 | 81,5  | 408 | 900  | 800  | +       | Adenin          |
| 1068 | 40    | 203 | 800  | 700  | +       | Adenin          |
| 2627 | 69,5  | 347 | 1200 | 1100 | +       | Adenin/Threonin |
| 1342 | 65    | 325 | 1000 | 1000 | +       | Adenin          |
| 2618 | 61    | 305 | 1000 | 900  | +       | Adenin          |
| 2816 | 27    | 134 | 150  | 200  | negativ | Adenin          |
| 199  | 116   | 587 | 1800 | 1900 | +       | Histidin        |
| 1906 | 60    | 300 | 450  | 1000 | +       | Adenin          |
| 2841 | 60    | 300 | 350  | 400  | +       | Adenin          |
| 1384 | 65,5  | 328 | 600  | 600  | +       | Adenin          |
| 2482 | 67    | 336 | 1200 | 1250 | +       | Adenin          |
| 1438 | 65    | 325 | 600  | 600  | +       | Adenin          |
| 2868 | 36    | 180 | 500  | 500  | +       | Adenin          |
| 2627 | 78    | 390 | 500  | 500  | +       | Adenin          |

Fortsetzung Tab. 4

|      |      |      |       |      |      |   |                     |
|------|------|------|-------|------|------|---|---------------------|
|      | 2833 | 36   | 180   | 500  | 500  | + | Adenin/<br>Threonin |
| +    | 1230 | 52   | 261   | 300  | 300  | + | Adenin              |
| +    | 1981 | 50   | 250   | 300  | 600  | + | Adenin              |
|      | 2105 | 29,5 | 197   | 600  | 600  | + | Adenin              |
| VIII | 1544 | 62,5 | 314   | 1200 | 600  | + | Adenin              |
|      | 2758 | 35,0 | 176   | 300  | 300  | + | Adenin              |
|      | 2422 | 26,5 | 133   | 300  | 350  | + | Adenin              |
|      | 1127 | 58,5 | 292,5 | 900  | 800  | + | Adenin              |
|      | 1635 | 59   | 295   | 300  | 800  | + | Adenin              |
|      | 2494 | 35,7 | 178,5 | 850  | 800  | + | Adenin              |
|      | 1377 | 56,4 | 282   | 800  | 800  | + | Adenin              |
|      | 2597 | 61   | 304,5 | 700  | 700  | + | Adenin/<br>Threonin |
|      | 2742 | 51   | 255   | 600  | 1200 | + | Adenin              |
|      | 1173 | 50   | 250   | 250  | 280  | + | Adenin              |
|      | 2634 | 69   | 344   | 850  | 800  | + | Adenin              |
| +    | 2397 | 76,5 | 384   | 200  | 200  | + | Adenin              |
|      | 1292 | 61   | 304   | 500  | 800  | + | Adenin              |
|      | 1847 | 32   | 160   | 200  | 500  | + | Adenin              |
|      | 349  | 81   | 405   | 1200 | 1300 | + | Histidin            |

|                     |        |      |       |      |      |   |        |
|---------------------|--------|------|-------|------|------|---|--------|
| X/VIII <sup>+</sup> | 2876   | 48   | 239   | 250  | 250  | + | Adenin |
| X                   | 2606   | 44   | 220   | 500  | 550  | + | Adenin |
|                     | + 1897 | 64   | 324   | 1300 | 1350 | + | Adenin |
|                     | + 2562 | 65   | 325   | 150  | 200  | + | Adenin |
|                     | 1297   | 50   | 250   | 600  | 650  | + | Adenin |
|                     | + 1019 | 70,5 | 353   | 800  | 850  | + | Adenin |
|                     | 1871   | 27   | 135   | 600  | 650  | + | Adenin |
|                     | 1647   | 52   | 295,5 | 800  | 850  | + | Adenin |
|                     | + 1663 | 81   | 405   | 900  | 750  | + | Adenin |

---

kanntlich einen Pantetheinfreien Fettsäuresynthetase-Komplex (86). Außer diesen Mutanten wurden geringe Einbauraten auch noch bei einer Reihe anderer fas2-Mutanten gefunden. Diese gehörten jedoch nicht mehr einer bestimmten, einheitlichen Komplementationgruppe an, sondern sie verteilten sich auf fast alle anderen bekannten fas2-Komplementationgruppen. Die Immunologische Untersuchung des Rohextraktes dieser Mutanten durch Ouchterlony Immun-Doppeldiffusionsanalyse ergab, daß mit Ausnahme von einer Mutante (fas2-2816) in allen Fällen Fettsäuresynthetase-Analoges CRM vorhanden war. Die negativen Markierungsergebnisse rührten daher tatsächlich von unterbliebenem <sup>14</sup>C-Pantothersäure-Einbau und nicht von einer fehlenden Synthese des ganzen Enzymkomplexes her. Auf ihre biochemische Charakterisierung wird weiter unten noch näher eingegangen werden. Diese Versuche haben somit jedenfalls keinen Anhaltspunkt für das Vorhandensein eines zweiten Cistrons ergeben, welches am Einbau von Pantethein in den Fettsäuresynthetase-Komplex der Hefe beteiligt ist.

Neben der erwähnten Methode der Doppel-Antikörperpräzipitation wurde auch noch versucht,

<sup>14</sup>C-Pantothensäure-markiertes Fettsäuresynthetase-Protein durch Trichloressigsäure aus dem Zellextrakt auszufällen und die in dem gewaschenen Niederschlag enthaltene Radioaktivität zu bestimmen. Eine mögliche Fehlerquelle bei dieser Methode könnte die Existenz noch anderer Pantethein-haltiger Proteine (102) in der Hefezelle sein. Dafür liegen allerdings bisher keine Hinweise vor. Abgesehen davon erwies sich diese Methode jedoch auch deswegen als nicht besonders gut brauchbar, da auch wiederholtes Waschen der Niederschläge zu keinem konstanten Endwert von Protein-gebundener Radioaktivität führte. Trotzdem sind die erzielten Ergebnisse in Tab. 3 und 4 auch mit aufgeführt.

Als Kontrollen dienten bei allen geschilderten Einbau-Versuchen bekannte, nicht-komplementierende fas-Mutanten, welche nachgewiesenermaßen keinen Fettsäuresynthetase-Komplex synthetisieren (83).

Als Kandidaten für eine nähere proteinchemische Charakterisierung kamen alle Mutanten in Frage, welche in den geschilderten Reihentests ungewöhnlich geringe <sup>14</sup>C-Pantothensäure-Einbau-

raten gezeigt hatten und nicht der schon bekannten Komplementationsgruppe VII angehören. Da andererseits auch einige Vertreter der Komplementationsgruppe VII deutliche  $^{14}\text{C}$ -Einbauraten aufwiesen, was im Widerspruch zu früheren Ergebnissen stand, sollte auch aus diesen Mutanten der Fettsäuresynthetase-Komplex isoliert und biochemisch näher untersucht werden. Alle aus diesen genannten Gründen für eine Anzucht in größerem Maßstab mit anschließender Fettsäuresynthetase-Reinigung vorgesehenen Mutanten sind in Tab. 4 besonders gekennzeichnet + .

(b) Nachweis der Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplexe durch Untersuchung des gereinigten Enzyms

---

Obwohl die zuvor geschilderten Versuchsreihen deutlich gemacht hatten, daß unter den uns zur Verfügung stehenden Fettsäure-bedürftigen Hefemutanten sich nur eine einzige genetisch klar definierbare Gruppe von Pantethein-freien Synthetase-mutanten befand, so sollte dennoch dem Befund nachgegangen werden, daß offenbar vereinzelt in allen fas2-Gruppen neben den üblichen, Pantethein-

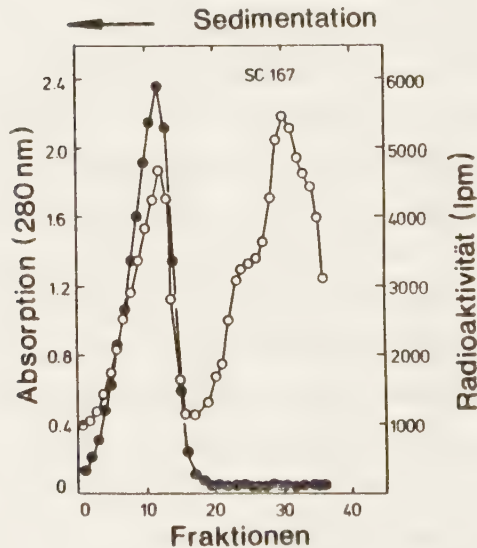
haltigen auch Pantethein-freie Mutanten auftreten. Falls sich dieser Befund bei der Untersuchung der entsprechenden gereinigten Enzyme bestätigen sollte, würde dies auf die Existenz weitreichender Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb des  $\alpha_6\beta_6$ -Komplex nochmals hindeuten.

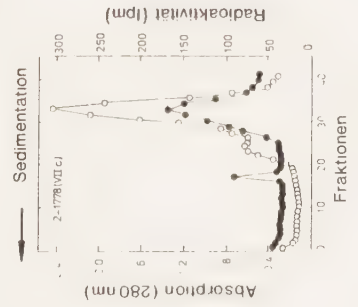
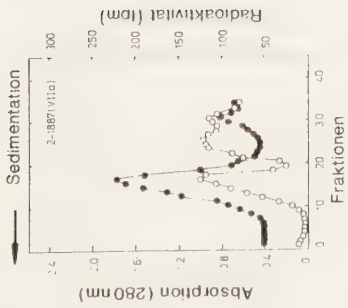
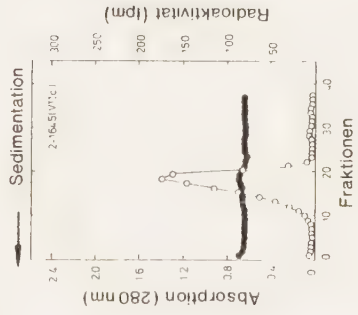
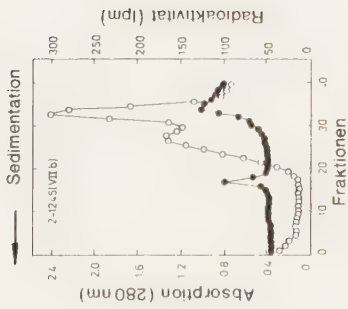
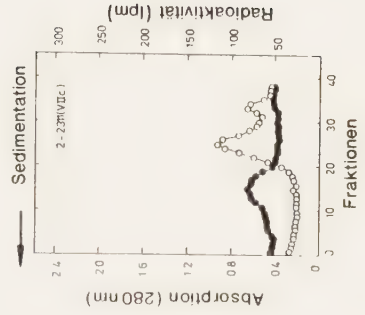
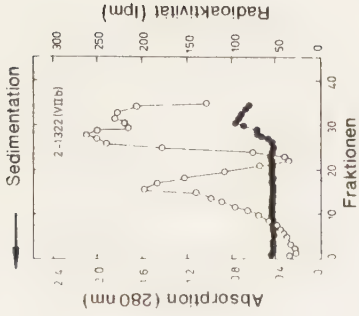
Die Ergebnisse der Untersuchungen an gereinigten Enzymen sind in Fig. 11 und, nach Komplementierungsgruppen geordnet, in Tab. 5 dargestellt. Aus ihnen geht hervor, daß mit Ausnahme der Mutante fas2-2562 nur die Mutanten der Komplementationsgruppe VII - und zwar in allen 3 Untergruppen - einen Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplex synthetisieren. Alle übrigen Kandidaten enthielten entweder doch einen Pantethein-haltigen Fettsäuresynthetase-Komplex, oder aber der negative Befund in den Voruntersuchungsreihen beruhte offenbar auf einer defekten Synthetase des ganzen Komplexes in diesen Mutanten. Zumindest konnte aus diesen Mutanten kein intaktes Enzym mit normalem Anreicherungs- und Sedimentationsverhalten isoliert werden. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, als die rohen Zellextrakte auch dieser, Fettsäuresynthetase-"freien", Mutanten in der Immun-Doppeldiffusions-Analyse

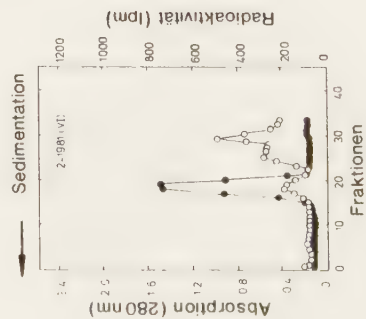
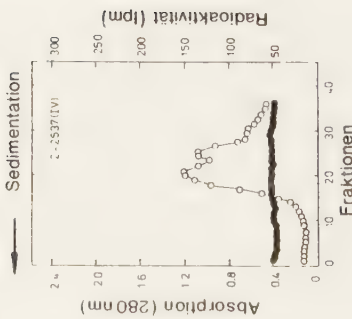
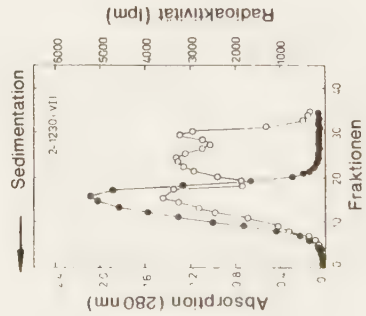
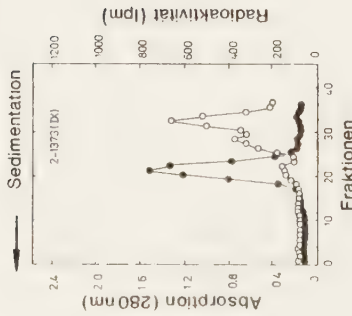
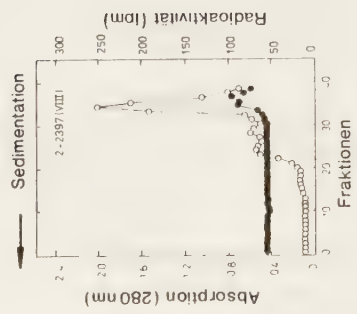
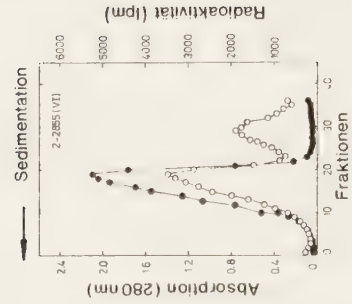
Fig. 11: Rohrzuckergradienten-Profile von gereinigten  
 $^{14}\text{C}$ -Pantethein-markierter Fettsäuresynthetasen  
aus Wildtyp und verschiedenen *fas2*-Mutanten

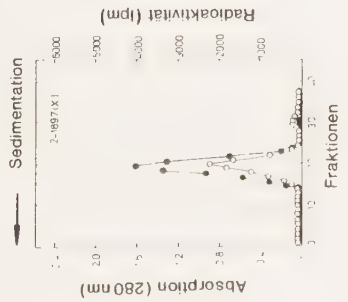
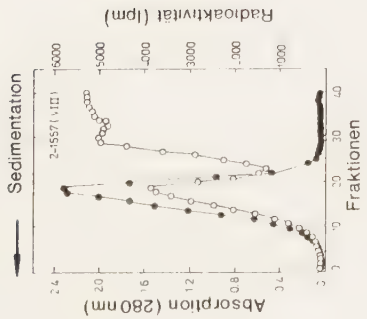
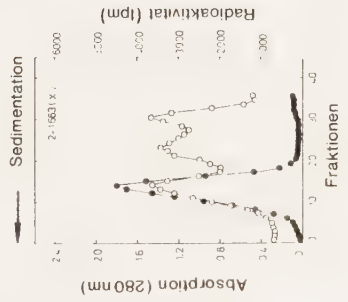
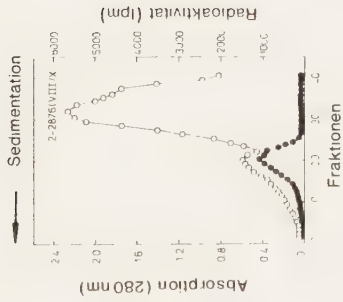
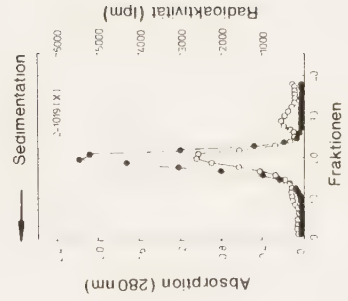
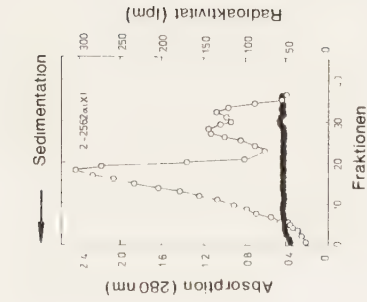
Experimentelle Einzelheiten bezüglich Anzucht und Markierung der Hefezellen, Isolierung und Gradientenzentrifugation des Enzyms vgl. Material und Methoden.

(o) = UV-Absorption, (●) = Protein-gebundene Radioaktivität pro 0,5 ml Fraktionsvolumen. Die Mutantenummern sind jeweils angegeben, römische Zahlen geben die Komplementationsgruppe an.









nach Ouchterlony eine deutliche Präzipitatbildung zeigten. Man muß daraus schließen, daß in diesen Mutanten nicht die Synthese des Enzyms als solche, sondern die Bildung oder Stabilität des hexameren Enzym-Komplexes beeinträchtigt ist. Es muß offen bleiben, ob eventuell als Folge einer solchen groben Veränderung der Enzymstruktur der Einbau der prosthetischen Pantetheingruppe unterbleibt.

Da die Mutanten der Komplementationsgruppe VII schon länger hinsichtlich ihres Defektes zur Synthese eines Pantethein-haltigen Holoenzym bekannt sind, ergab sich somit nur eine einzige neue Pantethein-freie fas2-Mutante (fas2-2562). Überraschenderweise gehört diese Mutante fas2-2562 zu einer Komplementationsgruppe, deren übrige Vertreter alle nicht nur einen normalen, sondern geradezu einen ungewöhnlich hohen Pantethein-Einbau in dem Fettsäuresynthetase-Komplex aufweisen (vgl. Tab. 5). Ein derartiges uneinheitliches biochemisches Verhalten von Mutanten derselben Komplementationsgruppe war unter den bisher untersuchten fas-Mutanten noch nie beobachtet worden. In der Annahme, daß es sich aus diesem Grund bei dieser Mutante um einen sehr speziellen Sonderfall und

nicht um die gesuchten Ligase-Mutanten handelt, wurde sie hier nicht mehr weiter biochemisch untersucht.

Tab. 5:  $^{14}\text{C}$ -Pantothenensäure-Einbau in den Fettsäuresynthetase-Komplex verschiedener, ausgewählter fas2-Mutanten

Die Anzucht der Hefezellen in  $^{14}\text{C}$ -Pantothenensäurehaltigem Minimalmedium sowie die Isolierung des Fettsäuresynthetase-Komplexes erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben.

| Mutante<br>Nr. | Komplementationsgruppe | gereinigtes Enzym |                                    |
|----------------|------------------------|-------------------|------------------------------------|
|                |                        | rel. Ausbeute     | $^{14}\text{C}$ -Pantethein-Gehalt |
|                |                        |                   | IpM/mg                             |
| 1887           | VIIa                   | normal            | 210                                |
| 1245           | VIIb                   | sehr gering       | -                                  |
| 1322           |                        | normal            | -                                  |
| 1778           | VIIc                   | sehr gering       | -                                  |
| 1645           |                        | normal            | -                                  |
| 2311           |                        | sehr gering       | -                                  |
| 2537           | IV                     | -                 | -                                  |
| 1373           | IX                     | gering            | 2490                               |
| 2855           | VI                     | normal            | 4250                               |
| 1981           |                        | gering            | 1930                               |
| 1230           |                        | normal            | 3660                               |
| 2397           | VIII                   | -                 | -                                  |
| 1557           |                        | normal            | 3775                               |
| 2876           | VIII/X                 | gering            | 2000                               |
| 2562           | X                      | normal            | -                                  |
| 1897           |                        | normal            | 4540                               |
| 1663           |                        | normal            | 3097                               |
| 1019           |                        | normal            | 5284                               |

5. Biochemische Charakterisierung gereinigter Mutanten-Fettsäuresynthetasen aus verschiedenen fas2-Komplementationsgruppen

---

Bei den zuvor geschilderten Untersuchungen zum Pantothersäure-Einbau in den mutierten Fettsäuresynthetase-Komplex, waren eine größere Zahl hochgereinigter fas2-Synthetasen erhalten worden. Nach der Bestimmung ihres  $^{14}\text{C}$ -Pantothersäure-Gehaltes wurden diese Enzyme im Interesse der Erweiterung unserer Kenntnis über mögliche Gen-Enzym-Wechselbeziehungen im fas-System der Hefe auch noch hinsichtlich ihrer verschiedenen anderen enzymatischen Funktionen untersucht. Dabei ergaben sich die in Tab. 6 zusammengestellten Ergebnisse. Die mit (+) gekennzeichneten Mutanten stammen vom Wildtyp SC 9 (X 2180-1A) ab. Die aus ihnen isolierten Fettsäuresynthetasen können daher auf Grund ihrer Abstammung nicht direkt mit den Fettsäuresynthetase-Teilaktivitäten des Enzyms aus Wildtyp SC 167 bzw. mit den von diesem Stamm abgeleiteten Mutanten verglichen werden.

Neben der Bestätigung bereits bekannter Teilenzym-Defekte in bestimmten fas2-Komplementationsgruppen ergab sich bei den Mutanten der Komplementationsgruppe X ein neuer, bisher nicht bekannter Typ von Fettsäuresynthetase-Defekten: Bei zwei von vier untersuchten

Mutanten war keine der sieben verschiedenen Teilreaktionen im Modellversuch vollständig ausgefallen, obwohl die Gesamtreaktion völlig inaktiv war. Die relativ niedrigen  $\beta$ -Ketoacylsynthase-Werte (vgl. Tab. 6) dieser Mutanten zeigen zwar, daß der genetische Defekt dieses Teilenzym deutlich geschädigt hat, daß aber außerdem noch eine andere bisher nicht bekannte Funktion im Komplex so beeinträchtigt wurde, daß die Synthetase-Reaktion als ganzes nicht mehr ablaufen kann. Eine solche Reaktion könnte z.B. die Komplex-interne Verschiebung von Substraten oder Intermediaten zwischen verschiedenen bekannten Bindungsstellen im Verlauf des Reaktionsprozesses sein. Genauere Kenntnisse hierzu liegen im Augenblick nicht vor.

Bei der enzymchemischen Charakterisierung der Mutanten der Komplementationsgruppe X zeigte die Mutante fas2-1663 ein besonders ungewöhnliches Verhalten, das noch bei keiner anderen fas-Mutante beobachtet worden war. Mit ihren natürlichen Substraten Malonyl- und Acetyl-CoA erreichte das gereinigte Mutantenenzym in der Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität beinahe den Wert des Wildtypenzym (vgl. Tab.6). Testet man die Gesamtreaktion jedoch mit den Modellsubstraten N,S-Diacetylcysteamine und S-Malonyl-,

Tab. 6: Teilaktivitäten von gereinigter Fettsäuresynthetase-Präparation aus Wildtyp und fas2-Mutantenzellen

Einzelheiten der Enzymreinigung und Aktivitätsbestimmungen, sowie der Enoyl-Reduktase nach Weithmann (66), wie in Material und Methoden beschrieben.  
+ = Test mit CoenzymA-Derivaten als Substraten  
++ = Test mit Cysteamin-Derivaten als Substraten

| Nr.<br>Mutante | Komplementations-<br>Gruppe | Spez. Enzymaktivitäten |                              |                               |                             |                              |                               |                  |                     |                                |  | % von<br>Wildtyp |
|----------------|-----------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------|---------------------|--------------------------------|--|------------------|
|                |                             | Gesamt-<br>reaktion    | Malonyl-<br>transfe-<br>rase | Palmityl-<br>transfe-<br>rase | Acetyl-<br>transfe-<br>rase | B-Keto-<br>acylsyn-<br>thase | B-Keto-<br>acylre-<br>duktase | Dehydra-<br>tase | Enoylre-<br>duktase | Pantothen-<br>säure-<br>Einbau |  |                  |
| SC 167         | Wildtyp                     | 710                    | 3400                         | 1285                          | 650                         | 17                           | 1760                          | 13               | 19                  | 100                            |  |                  |
| 1887           | VIIa                        | -                      | 1694                         | 1300                          | 539                         | -                            | 1366                          | 46               | 25                  | 8                              |  |                  |
| 1322           | VIIb                        | -                      | 1400                         | 2400                          | 297                         | -                            | 2215                          | 20               | 13                  | -                              |  |                  |
| 1645           | VIIc                        | -                      | 3450                         | 1290                          | 1390                        | -                            | 2200                          | 20               | 8                   | -                              |  |                  |
| 1230           | VI                          | -                      | 3027                         | 1290                          | 453                         | -                            | 1650                          | 15               | 11                  | 143                            |  |                  |
| 2855           |                             | -                      | 1937                         | 1290                          | 1192                        | -                            | 1600                          | 18               | 8                   | 160                            |  |                  |

|        |        |     |      |      |      |   |      |    |    |             |
|--------|--------|-----|------|------|------|---|------|----|----|-------------|
| 1557   | VIII   | -   | 1763 | 1300 | 1827 | 2 | -    | 27 | 14 | 147         |
| 2454   |        | 10  | 1726 | 2490 | 1323 | 7 | 5    | 13 | 6  | nicht gepr. |
| 2876   | VIII/X | -   | 1758 | 1290 | 809  | - | 970  | 11 | 8  | 78          |
| 2562   | X      | -   | 1700 | 2500 | 1323 | - | 1873 | 15 | 19 | -           |
| 2562a  |        | -   | 1322 | 2480 | 1205 | - | 2740 | 15 | 18 | nicht gepr. |
| 1019   |        | -   | 2450 | 1300 | 979  | 2 | 1405 | 13 | 6  | 207         |
| 1897   |        | -   | 3180 | 1290 | 904  | 3 | 1000 | 7  | 8  | 177         |
| 1663 + |        | 550 |      |      |      |   |      |    |    |             |
| ++     |        | 32  | 2910 | 2580 | 1335 | 9 | 2265 | 10 | 6  | 120         |
| 663(+) | VII    | -   | 796  | 3025 | 473  | - | 1638 | 12 | 9  | -           |
| 612(+) |        | -   | 3970 | 2520 | 2658 | - | 1597 | 13 | 7  | -           |
| 750(+) |        | -   | 8640 | 4250 | 940  | - | 2093 | 32 | 32 | -           |
| 655(+) |        | -   | 5320 | 2545 | 686  | - | 2350 | 21 | 22 | -           |
| 158(+) |        | -   | 7240 | 3390 | 578  | - | 2780 | 26 | 18 | -           |

N-Capryl-Cysteamin, so brach die Reaktion nach kurzem Lauf abrupt ab. Es zeigte sich, daß der Zeitpunkt des Abbruchs durch Erhöhung der eingesetzten Enzymmenge hinausgezögert werden kann. Eine quantitative Berechnung ergab, daß stets eine zur eingesetzten Menge Enzym äquivalente Menge (Mol/Mol) NADPH verbraucht wurde und daß die Reaktion danach abbrach (Tab. 7).

Durch Variation der Substrate konnte herausgefunden werden, daß die Ursache für dieses ungewöhnliche Verhalten offenbar im Modellsubstrat S-Malonyl-N-Capryl-Cysteamin begründet lag. Wurde es durch Malonyl-CoA ersetzt, lief die Gesamtreaktion mit wildtypartiger Geschwindigkeit weiter und endete erst mit dem Verbrauch eines der Substrate der Reaktion. Es ist also offensichtlich so, daß dieses Mutantenzym das Modellsubstrat N-Capryl-S-Malonyl-Cysteamin nicht mehr katalytisch in der Fettsäuresynthetase-Reaktion verwertet, sondern nur noch stöchiometrisch einen einzigen Reaktionsschritt damit durchführt und dann durch das kovalent gebundene Reaktionsprodukt blockiert wird. Eine Betrachtung des Reaktions-Schemas in Fig. 1 zeigt, daß von den verschiedenen Teilschritten eines C<sub>2</sub>-Verlängerungs-

zyklus' die Schritte Acetyl-Transfer, Malonyl-Transfer, Kondensation und 1. Reduktion offensichtlich ablaufen, daß aber eine der nachfolgenden Reaktionen innerhalb des Enzyms, wie etwa die Dehydration, die 2. Reduktion oder der Transfer von der "peripheren" auf die "zentrale" SH-Gruppe, gestört sein muß. Da Dehydratase und Enoyl-Reduktase, wenn mit Modellsubstraten einzeln getestet, völlig intakt waren, muß man annehmen, daß das für den Start einer neuen Verlängerungsrunde nötige Überwechseln von der peripheren auf die zentrale SH-Gruppe unterbleibt. Nach dem Schema in Fig. 1 sollte in diesem Fall allerdings auch die 2. Reduktion noch ablaufen. Da dies nicht der Fall ist, muß eine Abänderung des Reaktionsschemas erwogen werden derart, daß nicht erst die gesättigte Fettsäurekette, sondern schon die  $\beta$ -Hydroxy- oder  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Säure Komplex-intern auf die zentrale SH-Gruppe transferiert wird. Die Verwertung externer Modellsubstrate, wie sie beim Testen der verschiedenen Einzelreaktionen benutzt werden, wird von einem entsprechenden Defekt möglicherweise deswegen nicht betroffen, weil wahrscheinlich hier der Modellthioester direkt und nicht erst ein daraus gebildetes Acyl-Enzym umgesetzt wird. Mit dieser Vorstellung

Tab. 7: Gesamtaktivität der gereinigten Fettsäure-synthetase aus fas2-1663

Die Durchführung der Gesamtreaktion mit Cy-steaminderivaten als Substraten erfolgte nach der in Material und Methoden beschriebenen Vorschrift.

| Experiment<br>Nr. | eingesetzte<br>Enzymmenge | NADPH-<br>Verbrauch |
|-------------------|---------------------------|---------------------|
|                   | nMole                     | nMole               |
| I                 | 10,4                      | 10,6                |
| 2                 | 20,8                      | 21,1                |
| 3                 | 41,6                      | 41,5                |
| 4                 | 83,2                      | 83,3                |

eines schon früher stattfindenden Enzym-internen Intermediat-Transfers stimmen auch Befunde von Strom et al. (103) an der FSS aus Säugetieren überein. Sie berichten, daß die Reduktion der  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Verbindung nicht mit dem Pantethein-Thioester erfolgt.

Das Verhalten der übrigen Mutanten der fas2-Komplementationsgruppe X steht, wie schon oben erwähnt, mit der Annahme einer defekten Komplex-internen Übertragungsreaktion im Einklang. Warum allerdings eine Verwendung des Coenzym A-Esters der Malonsäure diesen Defekt zu unterdrücken vermag, kann vorerst nicht schlüssig erklärt werden. Da in vivo natürlich nicht das Modellsubstrat S-Malonyl-Cysteamin sondern Malonyl-CoA als Substrat vorliegt, ist diese Mutante auf Fettsäure-freiem Agar nicht völlig negativ, sondern lediglich "leaky" (= schwach wachsend). Schließlich kann vorerst auch nicht befriedigend erklärt werden, warum ein entsprechendes Verhalten nicht auch bei den anderen Mutanten dieser Komplementationsgruppe beobachtet wird. Vielleicht spielt hierbei auch noch die schon erwähnte zusätzliche Schwächung der Kondensationsreaktion in diesen Mutanten eine Rolle.

6.  $^{14}\text{C}$ -Acetyl-Beladung des Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplexes der Mutante fas2-2562 sowie Perameisensäureoxidation des gebildeten Acetyl-Enzyms
- 

Grundsätzlich war es denkbar, daß die im vorhergehenden Abschnitt geschilderte Mutante fas2-2562 ihr ungewöhnliches Verhalten (kein Pantethein-Einbau in den Fettsäuresynthetase-Komplex!) dem Umstand verdankt, daß externe  $^{14}\text{C}$ -markierte Pantothen-säure nicht in die Zelle eindringen kann und daß daher enzymgebundenes Pantethein ausschließlich endogen synthetisiert wird und somit unmarkiert bleibt.

Der beobachtete Ausfall der  $\beta$ -Ketoacyl-Synthetase Aktivität sprach zwar schon gegen diese Annahme, trotzdem wurde versucht, sie auch durch den Nachweis zu widerlegen, daß das fas2-2562 Enzym keine Substrat-Thioester Bindungen auszubilden vermag. Nach der in Fig. 1 gezeigten, ursprünglich von Lynen entwickelten Modellvorstellung hängt sowohl die Acetyl- wie die Malonylenzym-Thioesterbildung von dem Vorhandensein der "zentralen" Pantethein-Thiolgruppe ab.

Die Experimente mit  $^{14}\text{C}$ -Acetylenzym zeigten je-

doch, daß nur die Wildtyp-Fettsäuresynthetase, nicht aber das fas2-2562 Mutantenzym Perameisensäure-stabile Acetylgruppen gebunden enthielt (vgl. Tab. 8). Demnach scheint das Enzym tatsächlich keine Pantetheingruppen zu enthalten.

Tab. 8: Perameisensäure-Oxidation von I-<sup>14</sup>C-Acetyl-Fettsäuresynthetase aus fas2-2562

Die Durchführung der Experimente erfolgte wie in Tab. 2 beschrieben. Die Mengen waren hier jedoch 2,0 mg Fettsäuresynthetase und je 1  $\mu$ Mol I<sup>14</sup>C-Acetyl-CoA pro Test. (sp.Aktivität  $1,3 \times 10^7$  IpM/ $\mu$ Mol).

| Ansatz                                                              | Proteingebundenes<br><sup>14</sup> C-Acetat |      |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------|
|                                                                     | IpM                                         | %    |
| a) <u>Wildtyp</u>                                                   |                                             |      |
| <sup>14</sup> C-Acetylenzym + HCOOH                                 | 226000                                      | 100  |
| <sup>14</sup> C-Acetylenzym + HCOOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 56000                                       | 25   |
| b) <u>fas2-2562</u>                                                 |                                             |      |
| <sup>14</sup> C-Acetylenzym + HCOOH                                 | 132000                                      | 100  |
| <sup>14</sup> C-Acetylenzym + HCOOH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 122000                                      | 92,5 |

B. Reversible Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes, sowie in vitro-Komplementationsversuche mit gereinigten Mutantenenzymen

1. Dissoziation von  $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure- und  $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl-markierter Fettsäuresynthetase

In der Vergangenheit war, besonders im Lynen'schen Laboratorium, intensiv versucht worden, durch eine Reihe unabhängiger Methoden den Fettsäuresynthetase-Komplex in seine beiden Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  präparativ zu zerlegen. Alle dabei angewandten Methoden, wie z.B. Chromatographie an Hydroxylapatit in Gegenwart von SDS (104), Ionenaustauschchromatographie von Harnstoff-gespaltenen Fettsäuresynthetase isoelektrische Fokussierung in Gegenwart von Harnstoff im Zuckergradienten (101), sowie Einfrieren und Auftauen des Komplexes in Gegenwart von 1 M LiCl (64), hatten jedoch nicht zu dem gewünschten Erfolg geführt. Ein Durchbruch wurde auf diesem Gebiet erzielt, als es zunächst Wieland (67) und später auch Wakil mit Hefe-Fettsäuresynthetase (15) gelang, den Komplex durch eine vorübergehende chemische Modifizierung zu spalten und in seine Untereinheiten zu zerlegen.

Während Wakil die Auftrennung der Untereinheiten mit DEAE Bio-Gel A Chromatographie weniger gut gelang, konnte Wieland die modifizierten Untereinheiten durch Zuckergradientenzentrifugation vollständig und präparativ voneinander trennen (27). Zur Identifizierung der  $\alpha$ -Untereinheit wurde dabei der Fettsäuresynthetase-Komplex vor der Spaltung mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetamid beladen, von dem bekannt ist, daß es unter bestimmten Bedingungen ausschließlich an die  $\alpha$ -Untereinheit bindet (105). Da uns kein Ausschwingrotor vom Typ SW 41 zur Verfügung stand, wurde versucht, die Trennung der modifizierten Untereinheiten im Zuckergradienten mit einem Vertikalrotor (TV 850) durchzuführen. Fig. 12 zeigt die Auftrennung einer mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetamid markierten Fettsäuresynthetase-Präparation in die beiden Untereinheiten im Vertikalrotor. Offensichtlich ist die Trennung auf diese Weise genauso gut wie im SW 41-Rotor.

Bei Verwendung eines mit  $^{14}\text{C}$ -Pantothen säure markierten Enzyms konnte in entsprechender Weise die ausschließliche Bindung dieser prosthetischen Gruppe an die  $\alpha$ -Untereinheit nachgewiesen werden (vgl. Fig. 13). Dieser Befund bestätigt frühere Ergebnisse, die mit anderen Dissoziationstechniken wie SDS-

Gelelektrophorese und isoelektrische Fokussierung erhalten worden waren (101, 106).

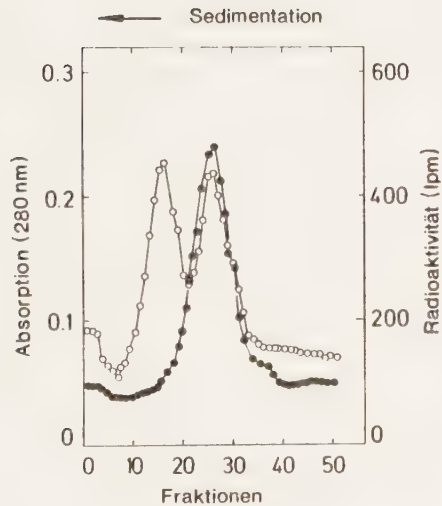


Fig. 12: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von  $\alpha$ - $^{14}\text{C}$ -Carboxamidomethyl -Fettsäuresynthetase aus Bierhefe nach DMMA-Spaltung

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben.

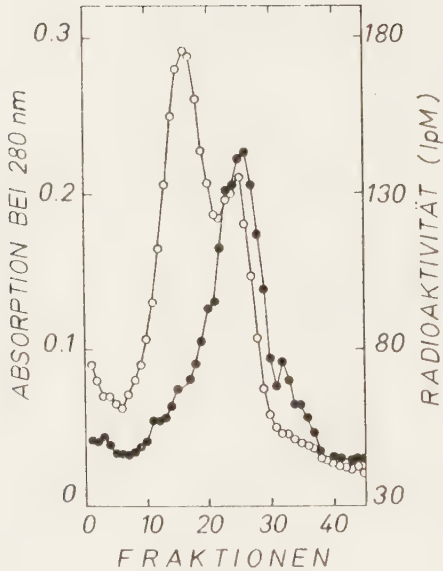


Fig. 13: Rohruckerdichte-Gradientenzentrifugation von  $^{14}\text{C}$ -Pantethein-markierter Fettsäuresynthetase nach DMMA-Spaltung

Aufgetragen wurden 2,2 mg gespaltenes Enzym, gelöst in 1 ml 0,02 M Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT. Gradient: 5-25 % Rohrucker (g/g) in 0,02 M Tris/HCl pH 7,5, 1 mM DTT. Laufzeit 10 Stunden bei 49.000 UpM und  $4^{\circ}\text{C}$  im TV 850 Rotor. Fraktionsvolumen 0,7 ml. Die Untereinheiten wurden anhand ihrer UV-Absorption (o) und die - Komponente anhand der proteingebundenen Radioaktivität (●) lokalisiert.



Fig. 14: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von Jodacetamid-behandelter Fettsäuresynthetase aus SC 167 Wildtyp-Hefe nach DMMA-Standard-spaltung

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben.

Für die Gewinnung von Antiseren gegen gereinigte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten wurde die in Fig. 13 gezeigte Trennung durch geeignete Veränderungen von Laufzeit und Gradienten-Steilheit noch weiter verbessert. Fig. 12 zeigt die so verbesserte Trennung der Untereinheiten einer  $^{14}\text{C}$ -Jodacetamid-beladenen Fettsäuresynthetase aus Bierhefe. Fig. 14 zeigt einen entsprechenden Versuch mit einem SC 167 Wildtypenzym. Eine Markierung mit  $^{14}\text{C}$ -Pantothensäure oder  $^{14}\text{C}$ -Jodacetamid wurde dabei nicht durchgeführt, ebensowenig die von Wieland beschriebene (67) enzymatische Charakterisierung der  $\beta$ -Untereinheit über die Acetyl-Transferase.

## 2. Isolierte Fettsäuresynthetase $\beta$ -Untereinheiten besitzen Enoyl-Reduktase-Aktivität

Nach dem von Lynen vorgeschlagenen Reaktions-Mechanismus reduziert die Enoylreduktase-Teilaktivität des Fettsäuresynthetase-Komplexes die ungesättigten Fettsäure-Intermediate, wenn sie als Thioester an die "zentrale" SH-Gruppe (4'-Phosphopantethein) des Enzyms gebunden sind. Die Möglichkeit mit der oben erwähnten präparativen Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes reine  $\alpha$  bzw.  $\beta$ -Untereinheiten

zu isolieren und zu untersuchen erlaubte es, die genannte Modellvorstellung experimentell zu überprüfen.

Ziegenhorn, Kresze und Strom (63, 65, 107) konnten die Fettsäuresynthetase-Reaktion auch dann mit Malonyl-CoA starten, wenn sie anstelle von N, S-Diacetylcysteamin N-Acetyl-S-Crotonylcysteamin verwendeten. Dieser Befund paßte insofern nicht in die genannten Vorstellungen über den Fettsäuresynthetase-Reaktionsmechanismus, als danach der N-Acetyl-Crotonyl-Rest an die "zentrale" SH-Gruppe gebunden wird und somit den Eintritt von Malonsäure in den Komplex blockieren sollte. Weiterhin findet Strom (107) bei Verwendung von N-Acetyl,-S-Crotonylcysteamin als Substrat eine kompetitive Hemmung der Enoylreduktase-Reaktion in Säugetier-Fettsäuresynthetase nur durch Acetyl-CoA, während Malonyl-CoA lediglich nicht-kompetitiv hemmt. Hierzu wurde, nach präparativer Trennung der modifizierten FSS-Untereinheiten und anschließender Entfernung der Acylgruppen vom Enzymprotein (vgl. Material und Methoden) die Enoylreduktase-Aktivität der isolierten  $\beta$ -Untereinheiten bestimmt. Ähnliche Messungen, allerdings mittels FMNH<sub>2</sub>-Oxidation durch Dichlorphenol-indophenol / O<sub>2</sub> anstelle des physiologischen

Crotonyl-Restes, waren auch schon von Wieland durchgeführt worden (67). Das Ergebnis des von uns durchgeführten Versuchs ist in Tab. 9 zusammengefaßt. Es zeigt, daß die isolierte  $\beta$ -Untereinheit eine deutliche und spezifische Enoylreduktase-Aktivität besitzt, welche durch Jodessigsäure hemmbar ist.

Tab. 9: Hemmung der Enoyl-Reduktase-Aktivität durch Jodessigsäure

Die Auftrennung der Fettsäuresynthetase-Untereinheiten im Rohrzuckergradienten sowie die Hemmung des Enzyms durch Jodessigsäure erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Die Aktivitätsbestimmung der Enoyl-Reduktase wurde anhand der Reduktion des Modellsubstrates N-Acetyl-S-Crotonylcysteamin optisch durchgeführt (66). Der Reaktionspuffer enthielt stets 10  $\mu$ M FMN, ohne FMN wurde selbst bei Verwendung von ungehemmter Synthetase keine Aktivität zurückerhalten.

| Enzym                                                                                               | Enoylreduktase-Aktivität |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
|                                                                                                     | mE/mg                    |
| 1. $\beta$ -Untereinheit aus intakter Fettsäuresynthetase                                           | 15                       |
| 2. $\beta$ -Untereinheit aus Jodessigsäure-gehemmter Fettsäuresynthetase                            | 15                       |
| 3. $\beta$ -Untereinheit aus intakter Fettsäuresynthetase, nachträglich mit Jodessigsäure inkubiert | -                        |

Dieser Befund zeigt zweierlei: erstens einmal, daß die isolierte  $\beta$ -Untereinheit mit Jodessigsäure alkylierbare SH-Gruppen besitzt, welche im intakten Komplex für den Hemmstoff unzugänglich sind. Bekanntlich reagieren unter den angewandten Versuchsbedingungen nur die periphere ( $\alpha$ -gebundene!), jedoch keine der in  $\beta$  enthaltenen SH-Gruppen mit Jodessigsäure (75). Zweitens spricht die Jodessigsäure-bedingte Enzym-Hemmung dafür, daß das Substrat Crotonsäure, um reduziert zu werden, von N-Capryl-Cysteamin auf eine SH-Gruppe am Enzym übertragen werden muß. Diese bisher nicht definierte SH-Gruppe liegt offensichtlich auf  $\beta$  und kann somit mit der auf  $\alpha$  lokalisierten "zentralen" oder "peripheren" SH-Gruppe nicht identisch sein. Dieser Befund stützt den schon weiter oben in dieser Arbeit (vgl. S.84 ) im Zusammenhang mit den Eigenschaften der Mutante fas2-1663 vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus, nach dem der Crotonylrest schon vor seiner Reduktion die zentrale SH-Gruppe verläßt und auf eine andere SH-Gruppe im Komplex übertragen wird. Die hier geschilderten Ergebnisse sprechen dafür, daß diese andere SH-Gruppe nicht die "periphere", sondern eine in  $\beta$  enthaltene bisher noch nicht definierte Thiolgruppe des Komplexes ist.

### 3. Immunologische Untersuchung der isolierten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten $\alpha$ und $\beta$

Nachdem die Fettsäuresynthetase-Untereinheiten einzeln und in reiner Form zur Verfügung standen, konnte auch ihre immunologische Kreuzreaktion gegenüber Antikörpern gegen den intakten Fettsäuresynthetase-Komplex untersucht werden. Fig. 15 zeigt, daß beide Untereinheiten im Ouchterlony Doppeldiffusionstest mit einem Antiserum gegen Gesamt-Synthetase eine Präzipitatbildung ergeben. Allerdings ist die Präzipitatbildung unterschiedlich stark ausgeprägt und mit  $\beta$  kräftiger als mit  $\alpha$ . Aus dem von Wieland und Lynen (108) vorgeschlagenen räumlichen Modell des Fettsäuresynthetase-Komplexes konnte man ein solches Verhalten ableiten, da hier tatsächlich die  $\beta$ -Untereinheit einen wesentlich größeren Anteil an der Moleküloberfläche besitzen als die  $\alpha$ -Untereinheit und dementsprechend bei der Immunisierung von Kaninchen möglicherweise mehr Antikörper gegen  $\beta$ - als gegen  $\alpha$ -Determinanten gebildet werden.

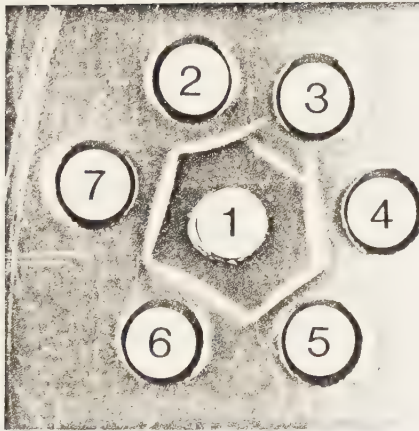


Fig.15: Ouchterlony-Doppeldiffusionsanalyse von nativer und denaturierter Fettsäuresynthetase sowie ihrer Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$

Das zentrale Loch enthielt 80  $\mu$ l unverdünntes Antiserum gegen native Fettsäuresynthetase. Von allen Antigen-Proben wurden jeweils 80  $\mu$ l mit einer Proteinkonzentration von 200  $\mu$ g/ml in eines der äußeren Löcher gegeben.

- 1 = Antiserum vom Kaninchen gegen Hefe-Fettsäuresynthetase (Titer 1:16)
- 2 = native Fettsäuresynthetase
- 3 =  $\alpha$  -Untereinheit
- 4 =  $\beta$  -Untereinheit
- 5 = native Fettsäuresynthetase
- 6 = SDS behandelte native Fettsäuresynthetase
- 7 =  $\alpha$  +  $\beta$  Untereinheit (1:1)

4. Negative Komplementation zwischen heterofunktionell  
defekten fas1-Mutanten in vivo

---

Während unter den immunologisch kreuzreagierenden, d.h. CRM-positiven fas1-Mutanten, negative Komplementation gewöhnlich nur zwischen isofunktionell defekten Mutanten ein und derselben Komplementationsgruppe beobachtet wurde, fällt bei der genaueren Prüfung der Komplementationskarte in Fig.2 auf, daß einige Mutanten der Gruppe II sowohl mit den Mutanten der Gruppe (II/Vb/Vc) wie auch mit der Mutanten fas1-1860 in Gruppe Vc keine Komplementation zeigten. Dieser Befund bestätigte sich auch bei einer Wiederholung der Komplementationsexperimente durch Johnston in diesem Institut.

Um die biochemische Grundlage dieses überraschenden genetischen Verhaltens kennen zu lernen, wurde die Fettsäuresynthetase aus den Mutanten fas1-1860, fas1-1700, fas1-1923 sowie aus dem diploiden Stamm fas1-1860 x fas1-1700 gereinigt und auf die verschiedenen Teilaktivitäten hin untersucht. In Tab.10 sind diese Aktivitäten, bezogen auf die entsprechenden Aktivitäten des Wildtypenzym, zusammengestellt. Die Mutante fas1-1923 wurde in die Untersuchung mit eingeschlossen, weil sie zu derselben Komplementa-

tionsgruppe (II) wie fas1-1700 gehört, aber im Gegensatz zu dieser Mutante mit fas1-1860 normal komplementiert (vgl. Fig. 2).

Man sieht, daß fas1-1923 offensichtlich spezifisch Enoylreduktase-defekt ist, während fas1-1700 zusätzlich zu diesem für die ganze Komplementationsgruppe II charakteristischen Defekt auch noch eine beträchtliche Reduzierung der Dehydratase-Aktivität aufweist. Da diese Teilaktivität in fas1-1860 vollständig fehlt, kommt es zu dem beobachteten stark verlangsamten Wachstum der fas1-1700 / fas1-1860 diploiden Kombination. Es erscheint unwahrscheinlich, daß die 3 Mutanten fas1-1860, fas1-1218 und fas1-1467 Dehydratase / Enoylreduktase-Doppelmutanten sind, da die erwähnte negative Komplementation in Kombination mit den meisten anderen Enoylreduktase-Mutanten nicht auftritt. Daher dürfte es sich eher um eine gleichzeitige Inaktivierung zweier funktioneller Domänen der  $\beta$ -Untereinheit durch ein und dieselbe Mutation handeln.

Aus Tab. 10 geht weiterhin hervor, daß viele Teilaktivitäten des aus der diploiden Zelle isolierten Enzyms deutlich über dem arithmetischen Mittel der entsprechenden Aktivitäten der beiden haploiden

Elternenzyme, ja sogar über denen des Wildtyp-  
enzymys liegen. Demgegenüber ist die Gesamtakti-  
vität sowohl in dem Enzym der haploiden Mutante  
fas1-1700 wie auch in dem des haploiden Stammes  
wesentlich niedriger als die geringste gemessene  
Einzelaktivität des Komplexes. Die Ursache liegt  
vermutlich entweder im Modellcharakter der Teil-  
enzym-Messungen oder in einem bisher unbekannten  
Zusammenspiel der Teilenzyme innerhalb des Komple-  
xes begründet.

Zur Klärung der Frage, ob die in vitro gemes-  
senen und in Tab. 10 enthaltenen Enzymaktivitäten  
auch physiologisch von Bedeutung sind und sich  
auch in vivo im Wachstumsverhalten der entspre-  
chenden Mutanten ausprägen, wurden Wachstumskine-  
tiken in Fettsäure-freiem YEP-Medium mit einigen  
der in Tab.10 aufgeführten Stämme durchgeführt.  
Aus den in Fig. 16 gezeigten Kinetiken geht her-  
vor, daß verglichen mit den Wachstumsraten von  
haploider und diploider Wildtyp-Hefe sowohl die  
beiden Mutanten fas1-1860 und fas1-1700, wie  
auch der aus ihnen hergestellte diploide Stamm  
in Abwesenheit externer Fettsäuren praktisch kei-  
ne bzw. eine beträchtlich verringerte Teilungs-  
aktivität aufweisen. Das gilt zunächst so lange,

Experimentelle Einzelheiten der Enzymisolierung und der Testverfahren sind in Material und Methoden beschrieben. Die Enoyl-Reduktase-Aktivität wurde jeweils mittel Diaphorase-Test und durch die Reduktion des Modellsubstrates N-Acetyl-S-Crotonyl-Cysteamin ermittelt.

| Enzym                       | Enzym-Aktivitäten                            |                                                 |                                                 |                                                        |
|-----------------------------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
|                             | <u>fas1-1860</u><br>(Dehydratase-<br>"neg.") | <u>fas1-1700</u><br>(Enoylreduktase-<br>"neg.") | <u>fas1-1923</u><br>(Enoylreduktase-<br>"neg.") | <u>fas1-1860</u><br>x<br><u>fas1-1700</u><br>(diploid) |
| Gesamtreaktion              | -                                            | 0,7                                             | -                                               | 10                                                     |
| Acetyl-Transferase          | 151                                          | 94                                              | 77                                              | 101                                                    |
| Malonyl-Transferase         | 81                                           | 103                                             | 77                                              | 311                                                    |
| Palmityl-Transferase        | 123                                          | 177                                             | 46                                              | 213                                                    |
| Enoyl-Reduktase             | 55                                           | 18                                              | -                                               | 28                                                     |
| Dehydratase                 | -                                            | 35                                              | 132                                             | 39                                                     |
| $\beta$ -Ketoacyl-Synthase  | 61                                           | 160                                             | 300                                             | 158                                                    |
| $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase | 54                                           | 69                                              | 100                                             | 108                                                    |

% Wildtyp-Aktivität

als die Kulturen Revertanten-frei geblieben waren, d.h. für die haploiden Mutanten während der ersten 30, für die diploide während der ersten 20 Stunden. Das danach einsetzende Überhandnehmen von Revertanten bzw. Rekombinanten in den Kulturen macht die späteren Meßwerte bedeutungslos.

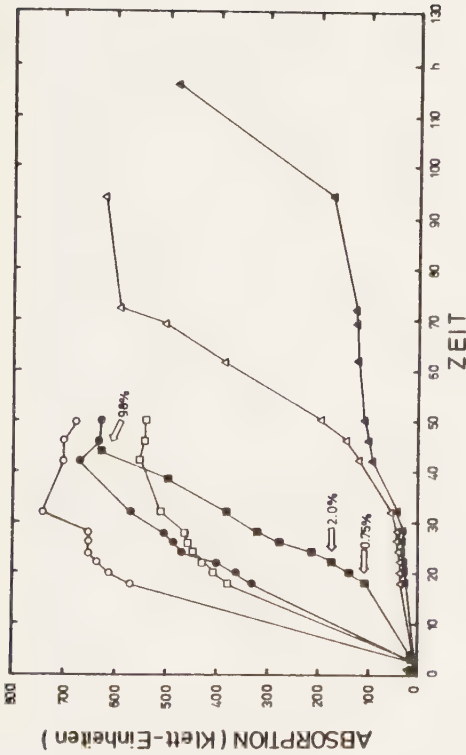


Fig. 16: Wachstumsverhalten der in Tab. 8 enthaltenen fas-Mutanten und Wildtyp-Stämme in Fett-säure-freiem Medium

Die Haploiden fas1-1860 (▲), fas1-1700 (Δ), SC 167 (●) und SC 177 (○) sowie die Diploiden fas1-1860 x fas1-1700 (◻) und SC 167 x SC 177 (o) wurden zunächst aus einem Einzelklon in 10 ml YEP-FS Medium bei 30° C angezogen. Bei Erreichen der mittleren log. Phase (300 Klett-Einheiten) wurden je 0,5 ml (1,5 x 10<sup>7</sup> Zellen) entnommen und damit jeweils 250 ml YEP-Medium in Schnabelkolben angeimpft. Die Kulturen wurden bei 30° C unter Schütteln angezüchtet und in den angegebenen Zeitabständen die Zelldichte am Klett-Summerson-Kolorimeter bestimmt. Die Pfeile geben den prozentualen Gehalt der Kultur an Revertanten an.

5. Dissoziation und Reassoziation von Fettsäuresynthetase-Komplexen aus verschiedenen heterofunktionell defekten fas-Mutanten sowie aus verschiedenen Wildtyp-Hefestämmen

---

Nachdem von Wieland und Lynen (27) erstmals die reversible Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe durchgeführt worden war, sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, unter Verwendung geeigneter fas-Mutantenenzyme mit derselben Methodik in vitro Komplementationsversuche durchzuführen. Dazu wurden zunächst Vorversuche mit geeigneten Enzymen aus kommerzieller Bierhefe und dem genetisch definierten haploiden Stamm SC 167 durchgeführt. Nach Einführung bestimmter Modifikationen der Originalvorschrift gelang es, die Reaktivierung des gespaltenen Enzyms so zu lenken, daß wieder ein voll aktives Präparat erhalten wurde (Tab. 11).

In diesen Reassoziationsexperimenten wurde der rückgebildete Komplex von unassoziiert gebliebenen Untereinheiten und dem bei der Reassoziation als Stabilisator zugesetztes Serumalbumin durch Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt (vgl. Fig. 17). Nur so war es möglich, die spezifische Aktivität des reassozierten Komplexes exakt zu bestimmen.

Tab. 11: Enzymaktivitäten nativer und reassoziierter Fettsäuresynthetasen aus Bierhefe und dem Wildstamm SC 167

Experimentelle Durchführung vgl. Material und Methoden

| Enzym Funktionen            | Enzymaktivitäten       |              |                              |              |              |              |
|-----------------------------|------------------------|--------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
|                             | FSS (Bierhefe, frisch) |              | FSS (Bierhefe, 3 Monate alt) |              | FSS (SC 167) |              |
|                             | nativ                  | diss.-reass. | nativ                        | diss.-reass. | nativ        | diss.-reass. |
|                             | m Einheiten / mg       |              |                              |              |              |              |
| Gesamt Reaktion             | 1200                   | 1233         | 640                          | 1200         | 712          | 690          |
| Acetyl Transferase          | 1200                   | 1200         | 1230                         | 1200         | 647          | 980          |
| Malonyl Transferase         | 1000                   | 975          | 948                          | 980          | 3477         | 3700         |
| Palmityl Transferase        | 2500                   | 2575         | 2480                         | 2500         | 1370         | 1460         |
| Enonyl Reduktase            | 26                     | 47           | 25,4                         | 47           | 15,3         | 23,4         |
| Dehydratase                 | 13                     | 12,8         | 12                           | 12,5         | 14,5         | 10,5         |
| $\beta$ -Ketoacylsynthase   | 8                      | 8,45         | 7,3                          | 8,45         | 19           | 16,3         |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | 3200                   | 3000         | 1270                         | 2860         | 1750         | 2920         |

Eine derartige Reinigung der reassozierten Fettsäuresynthetase erschien uns angebrachter als das von Wieland beschriebene Äquilibrieren über Sephadex G 50, um das restliche Ammoniumsulfat abzutrennen. Die Abtrennung von nicht assoziierten Untereinheiten und von dem in großer Menge zur Stabilisierung eingesetzten Serumalbumin gelingt über eine Sephadex G 50 - Behandlung nicht. Man sieht an Fig. 17 außerdem, daß das Sedimentationsverhalten und damit das Molekulargewicht des reassozierten Komplexes von dem des nativen Ausgangsenzyms (vgl. Fig. 22) nicht zu unterscheiden ist.

Die Ausbeute bei der Reassoziationsbehandlung von frischen Enzympräparationen betrug durchschnittlich ca. 90 %. Bei älteren Präparationen sank sie dagegen deutlich ab ( > 30 %). Allerdings zeigte sich, daß bei gealterten und nicht mehr voll aktiven Enzymen durch die Dissoziation Reassoziations-Behandlung wieder ein Präparat mit der ursprünglich hohen spezifischen Aktivität erhalten werden kann (vgl. Tab. 11). Hierbei dürfte es sich um ein "Aussortieren" von gealterten, d.h. durch die Lagerung inaktivierten Untereinheiten handeln. Offenbar besitzen solche Untereinheiten eine geringere Reassoziationsneigung. Aus Tab. 11 geht weiterhin hervor, daß die Reakti-

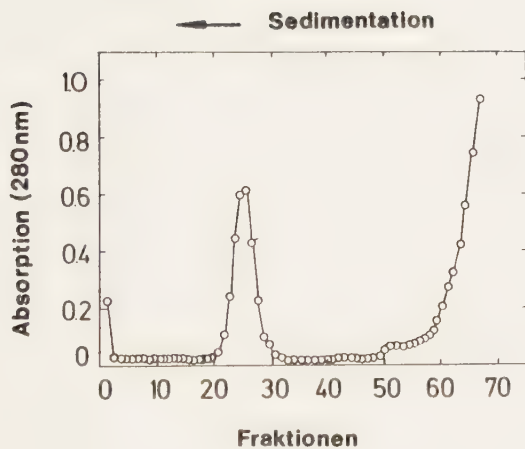


Fig. 17: Reinigung des rückgebildeten Fettsäuresynthetase-Komplexes aus dem Reassoziationsgemisch durch Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation

Bezüglich der experimentellen Durchführung vgl. Material und Methoden.

vierung eines gealterten Enzyms durch die Dissoziation Reassoziations-Behandlung ganz offensichtlich auf einer Entfernung inaktiver  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase Komponenten, d.h. also von  $\alpha$ -Untereinheiten beruht.

Aus Tab. 11 wird auch deutlich, daß die spezifische Gesamtaktivität von Fettsäuresynthetasen vergleichbarer Reinheit, aber unterschiedlicher Herkunft beträchtliche und offenbar Stammspezifische Unterschiede aufweisen kann. Die gleichzeitige Bestimmung der verschiedenen Teilaktivitäten erlaubt dabei Rückschlüsse auf diejenige(n) Komponente(n) des Komplexes, die hierfür verantwortlich sein könnte(n). Nach den in Tab. 11 aufgeführten Daten kommt hierfür vor allem die Palmityl- und Acetyl-Transferase, nicht aber die Ketoacyl-Synthase in Frage. Dieser Befund ist bemerkenswert, da bisher stets die Kondensationsreaktion für den limitierenden Schritt der Fettsäuresynthase gehalten wurde. Offenbar können die mit den Modellsubstraten gemessenen Teilaktivitäten nicht als repräsentativ für den tatsächlichen Reaktionsablauf angesehen werden.

Bei der DMMA-Spaltung des Fettsäuresynthetase-

Komplexes und der anschließenden Gelfiltration des Spaltgemisches verlieren die modifizierten Untereinheiten ihr Flavin. Seit der Arbeit von Oesterheldt (90) ist bekannt, daß der FMN-Gehalt des Hefeenzym 5 - 6 Mole FMN pro Mol Fettsäuresynthetase beträgt. Das Flavin ist nicht-kovalent an das Enzymprotein gebunden (39). Bei der Reassoziation von Fettsäuresynthetase muß daher dem Reaktivierungsansatz freies FMN zugesetzt werden. Umgekehrt erlaubt ein Weglassen des Cofaktors, den Einfluß von FMN auf die Struktur und die verschiedenen Teilaktivitäten des Komplexes zu untersuchen. Schließlich kann auch durch Ersatz von FMN durch ein anderes Flavin wie etwa FAD Aufschluß über die Spezifität des Coenzym hinsichtlich der genannten Kriterien erhalten werden. Tab. 12 zeigt die Ergebnisse entsprechender Experimente. Wie erwartet, ist in einem Flavin-freien Apoenzym sowohl die Gesamtaktivität wie auch die Enoyl-Reduktase Teilaktivität negativ. Dagegen werden die Rückbildung der Komplexstruktur wie auch die Aktivitäten der übrigen Teilenzyme durch die Abwesenheit von FMN offenbar nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtung deckt sich mit alten Befunden aus dem Lynen'schen Laboratorium (39), in dem das Flavin durch saure Ammonsulfatfällung des Komplexes schonend und reversibel

aus dem Enzym entfernt werden konnte ohne Beeinträchtigung anderer Teilaktivitäten (109).

Weiterhin ist aus Tab. 12 ersichtlich, daß FMN grundsätzlich durch FAD ersetzbar ist, daß jedoch die spezifische Enoylreduktase-Aktivität, und als Folge dessen auch die Gesamtaktivität des FAD-haltigen Komplexes, verglichen mit dem entsprechenden FMN-haltigen Enzym um etwa 30 % reduziert ist. Aus diesem Befund könnte geschlossen werden, daß die Enoyl-Reduktase das limitierende Teilenzym des Komplexes ist. Dies steht jedoch nicht in Einklang mit den weiter oben diskutierten Befunden an gealterten Enzymen (vgl. Tab. 11).

Es zeigte sich auch bei diesen Versuchen wieder, daß ebenso wie bestimmte Enoylreduktase-defekte Mutanten-Komplexe die künstlich Flavin-frei hergestellten und damit ebenfalls Enoylreduktase-defekten Fettsäuresynthetase-Präparationen eine gegenüber dem entsprechenden Holo- bzw. dem Wildtypenzym bis zu 10fach gesteigerte  $\beta$ -Ketoacylsynthetase-Aktivität aufwiesen. Anders als das in vitro hergestellte Wildtyp-Apoenzym waren die Enoylreduktase-defekten Mutanten-Komplexe jedoch niemals FMN-frei.

Tab. 12: Einfluß verschiedener Flavine auf die Reassoziaton und Reaktivierung von DMMA-gespaltener Fettsäuresynthetase an Bierhefe

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben. In Experiment 3 und 4 wurde das Enzym in Gegenwart des Flavins reassoziert, in Experiment 5 und 6 wurde das Flavin nachträglich zum reassozierten Apoenzym zugegeben.

| Enzym Funktionen     |      | Enzymaktivitäten |                    |                   |                   |                 |                 |
|----------------------|------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Experiment:          |      | 1                | 2                  | 3                 | 4                 | 5               | 6               |
|                      |      | nativ            | reass.<br>ohne FMN | reass.<br>mit FMN | reass.<br>mit FAD | reass.<br>+ FMN | reass.<br>+ FAD |
|                      |      | m Einheiten / mg |                    |                   |                   |                 |                 |
| Ges. Reaktion        | 1200 | negativ          |                    | 1233              | 860               | 630             | 323             |
| Acetyl-Transferase   | 1200 |                  | 1200               | 1200              | 1200              | 1200            | 1200            |
| Malonyl-Transferase  | 1000 |                  | 957                | 973               | 980               | 975             | 975             |
| Palmityl-Transferase | 2500 |                  | 2510               | 2575              | 2530              | 2570            | 2570            |
| Enonyl-Reduktase     | 26   | negativ          |                    | 47                | 28                | 20              | 12              |
| Dehydratase          | 13   |                  | 13                 | 12,8              | 13                | 13              | 13              |
| β-Ketoacyl-Synthase  | 8    |                  | 26                 | 8,45              | 8,5               | 6,7             | 6,1             |
| β-Ketoacyl-Reduktase | 3200 |                  | 2430               | 3000              | 2500              | 2375            | 2375            |

Schließlich wurde auch noch untersucht, inwieweit der Zeitpunkt der FMN-Einlagerung, entweder in den intakten Apoenzym-Komplex oder an die noch unassoziierten Untereinheiten, einen Einfluß auf die Aktivität und den FMN-Gehalt der reassozierten Synthetase hat. Aus Tab.12 geht hervor, daß eine 100 %ige Reaktivierung vom FMN-freien Apoenzym nur bei FMN-Zugabe zu den noch nicht assoziierten Untereinheiten erhalten wird. Späterer FMN-Zusatz, d.h. nach Bildung des Apo-Komplexes, führt nur zum Einbau von etwa halb soviel FMN wie im erstgenannten Fall und dementsprechend beobachtet man auch eine vergleichsweise nur halb so aktive Enoyl-Reduktase und Gesamtreaktion. Möglicherweise zeigen im Komplex die Hälfte der FMN-Bindungsstellen nach außen und der Rest ist unzugänglich im Inneren des Komplexes verborgen. Ähnliche Überlegungen wurden auf Grund von Substratbindungsstudien von Lynen und Mitarbeitern (106) auch für die Acetyl-, die Malonyl- und die Palmityl-Bindungsstellen des Komplexes angestellt.

6. In vitro Komplementation gereinigter Fettsäure-  
synthetase-Mutantenenzyme

Die oben geschilderte Methode der reversiblen Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes in seine Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sollte es auch erlauben, im Reagensglas durch Verwendung eines Gemisches geeigneter Mutantenenzyme hybrid zusammengesetzte Komplexe zu konstruieren. Solche hybriden Komplexe sollte denen entsprechen, die sich in vivo bei der sogenannten Komplementation von haploiden fas-Mutanten in entsprechenden Diploiden bilden (110). Die enzymchemischen Eigenschaften des Hybrid-Komplexes sollten sich in charakteristischer Weise von denen der reinen Ausgangsenzyme unterscheiden. Daraus wiederum könnten Schlüsse gezogen werden hinsichtlich struktureller und funktioneller Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen Untereinheiten im Komplex.

Bisher war es noch keiner Arbeitsgruppe gelungen, die Untereinheit  $\alpha$  und  $\beta$  der Hefe-Fettsäuresynthetase präparativ voneinander zu trennen, ohne daß dabei die Aktivität der  $\alpha$  -Untereinheit völlig verloren ging (67). Man konnte daher bei den ins Auge gefaßten Versuchen keine gereinigten und voneinander

abgetrennten  $\alpha$  - und  $\beta$ -Untereinheiten miteinander kombinieren. Statt dessen wurden beide Enzymkomplexe jeder für sich einzeln dissoziiert, dann zu gleichen Teilen (g/g) miteinander gemischt und so zur Reassoziatio n gebracht. Auf diese Weise bildet sich zwar kein homogenes Hybridenzym-Präparat definierbarer Zusammensetzung, dies ist jedoch auch in vivo in einer komplementierenden diploiden Zelle nicht der Fall.

Eine gemeinsame Spaltung der jeweils in Frage kommenden Mutantenenzyme ist nicht möglich, da der Bedarf an DMMA je nach Mutante die beim Wildtypenzym angewandte Menge übersteigen kann. Die Vollständigkeit der Spaltung wird nach Wieland (67) über den Aktivitätsverlust der  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase zeitlich verfolgt. Es ist bekannt, daß diese Teilaktivität nur bei komplexgebundener, jedoch nicht mehr in der freien  $\alpha$  -Untereinheit nachgewiesen werden kann (67). Um die Aktivität der  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase zum Verschwinden zu bringen, mußte bei manchen Mutantenenzymen mehr als die doppelte Menge an DMMA als beim Wildtypenzym eingesetzt werden. Der reassozierte Komplex wurde wie üblich von den eventuell noch nicht assoziierten Untereinheiten durch Rohrzuckergradienten-Zentrifugation abgetrennt und auf



Fig. 18: Intergene und intragene Komplementation von fas1- und fas2-Mutanten in vivo.

Die zu komplementierenden haploiden *fas*-Mutanten wurden jeweils einzeln und als Paarungsgemisch (1:1) auf fettsäurehaltigem YEPFS-Agar (jeweils die obere Platte) ausgestrichen und bei 30° C 1-2 Tage inkubiert. Danach wurden die Platten auf Fettsäure-freiem YEP-Agar überstempelt (untere Platte) und erneut 2 Tage bei 30° C inkubiert.

Gesamt- und Teilaktivitäten hin untersucht.

In den hier geschilderten Experimenten wurden zwei grundsätzlich verschiedene Arten von Fettsäuresynthetase-mutanten-Komplexen miteinander in vitro rekombiniert: solche, in denen jeweils dieselbe und solche, in denen jeweils eine andere Untereinheit durch Mutation inaktiviert war. In vivo bezeichnet man die Wiederherstellung der Enzymaktivität in der erstgenannten Mutanten-Kombination als intragene Komplementation, im zweiten Fall als intergene Komplementation. Das in vivo Komplementationsverhalten der hier untersuchten Mutanten zeigt Fig. 18. Man sieht, daß in allen Fällen die Einzelmутanten auf Fettsäure-freiem Agar keinerlei Wachstum zeigen, während die aus ihnen gebildeten Diploiden sich von fas-prototrophen Wildtypzellen nicht unterscheiden.

(a) Intergene Komplementation

Tab. 13 zeigt das Ergebnis der Rekombination von Fettsäuresynthetase-Untereinheiten aus den gereinigten Enzymen einer fas1-Mutante ( $\beta$ -Defekt) und einer fas2-Mutante ( $\alpha$ -Defekt). Die Gesamt- und Teilaktivitäten der beiden Ausgangsenzyme

Tab. 13: In vitro Komplementation zwischen gereinigten fas1 und fas2 Mutanten-Enzymen  
Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben

| Enzym Funktion              | Enzym - Aktivitäten |                  |                  |                  |                       |
|-----------------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
|                             | Exp.Nr. 1           | 2                | 3                | 4                | 5                     |
|                             | <u>fas2-1557</u>    | <u>fas1-1923</u> | <u>fas2-1557</u> | <u>fas2-1557</u> | <u>Wildtyp SC 167</u> |
|                             |                     |                  | +                | x                |                       |
|                             |                     |                  | <u>fas1-1923</u> | <u>fas1-1923</u> | <u>diss.-</u>         |
|                             |                     |                  | (1:1)            | diss.-reass.     | nativ reass.          |
| <hr/>                       |                     |                  |                  |                  |                       |
|                             |                     | m                | Einheiten / mg   |                  |                       |
| Gesamt Reaktion             | -                   | -                | -                | 650              | 710                   |
| Acetyl Transferase          | 1827                | 1394             | 1500             | 1140             | 593                   |
| Malonyl Transferase         | 1763                | 2618             | 2190             | 2995             | 3378                  |
| Palmityl Transferase        | 2470                | 1670             | 2000             | 2500             | 1233                  |
| Enoyl Reduktase             | 13,9                | -                | 7,0              | 48               | 19,4                  |
| Dehydratase                 | 27                  | 29               | 28               | 12,5             | 12,3                  |
| $\beta$ -Ketoacyl Synthase  | 1,15                | 18               | 10               | 6,0              | 16                    |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | -                   | 3560             | 1650             | 1715             | 1797                  |
|                             |                     |                  |                  |                  | 2920                  |

wie des aus ihnen in vitro hergestellte Hybrid-enzym ist in Experiment 1, 2 und 4, Tab. 13, dargestellt. Man sieht, daß die beiden Einzelenzyme in zwei unterschiedlichen Teilfunktionen des Komplexes ( $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase bzw. Enoyl-Reduktase) einen jeweils spezifischen Defekt aufweisen. Dementsprechend ist auch in beiden Fällen die Gesamtaktivität verschwunden. Auch ein einfaches 1 : 1 Gemisch beider Mutantenenzyme vermag die Fettsäuresynthetase-Gesamtreaktion nicht zu katalysieren (Exp. 3 in Tab. 13). Bekanntlich bleiben die Reaktionszwischenprodukte des Prozesses kovalent an jedes Enzymmolekül gebunden und können somit nicht zwischen verschiedenen Fettsäuresynthetase-Molekülen ausgetauscht werden. Erwartungsgemäß stellen die spezifischen Aktivitäten der beiden geschädigten Teilenzyme in der 1 : 1 Mischung ziemlich genau das arithmetische Mittel aus den Werten der beiden Ausgangsenzyme dar.

Betrachtet man demgegenüber den Hybridkomplex, der sich aus dem Untereinheiten-Gemisch der beiden dissoziierten Mutantenkomplexe zurückbildete, so wird deutlich, daß hier zusätzlich zu den Teilfunktionen auch die Fettsäuresynthetase-Gesamt-

funktion wieder reaktiviert wurde (Exp. 4 in Tab. 13). Die spezifische Gesamtaktivität des reaktivierten Komplexes erreicht nahezu den Wildtyp-Wert und ist damit unerwartet hoch: theoretisch sollten sich nur 25 % Wildtyp-artige  $\alpha\beta$  - Protomere bilden neben 75 %  $\alpha\beta$  - Kombinationen, welche mindestens eine defekte Untereinheit enthalten. Es lassen sich mehrere Erklärungsmöglichkeiten für diese Beobachtung diskutieren. Sie sollen an anderer Stelle in dieser Arbeit ausführlicher erörtert werden (vgl. Diskussionsteil Seite 158).

b) Intragene Komplementation zwischen iso- und heterofunktionell defekten fas2-Mutationen

Als nächstes wurde versucht, auch die in vivo beobachtete Komplementation zwischen bestimmten allelen fas1- bzw. fas2-Mutationen in vitro nachzuvollziehen. Es wurden dazu zwei verschiedene fas2 Mutanten-Kombinationen ausgewählt. Von ihnen trug das eine Mutanten-Paar einen isofunktionellen  $\alpha$  - Defekt ( $\beta$ -Ketoacyl-Synthase), das andere zwei verschiedene  $\alpha$  -Defekte ( $\beta$ -Ketoacyl-Synthase und  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase).

Tab. 14: Intragene in vitro Komplementation zwischen 2 heterofunktional defekten fas2 Mutanten-Enzymen

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben.

| Enzym Funktionen            | Enzym Aktivitäten                                     |                                                            |                                                                  |                                                                                     |                                       |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
|                             | fas2-2876<br>( $\beta$ -Ketoacyl-Synthase<br>negativ) | fas2-2454<br>( $\beta$ -Ketoacyl-<br>Reduktase<br>negativ) | $\frac{\text{fas2-2876}}{+}$<br>$\frac{\text{fas2-2454}}{(1:1)}$ | $\frac{\text{fas2-2876}}{\times}$<br>$\frac{\text{fas2-2454}}{\text{diss.-reass.}}$ | Wildtyp <u>WT</u> 167<br>diss.-reass. |
| Gesamt Reaktion             | -                                                     | m Einheiten / mg                                           |                                                                  |                                                                                     |                                       |
| Acetyl Transferase          | 845                                                   | 10 5                                                       | 1048                                                             | 115                                                                                 | 690                                   |
| Malonyl Transferase         | 1758                                                  | 1290                                                       | 1725                                                             | 1050                                                                                | 980                                   |
| Palmityl Transferase        | 2475                                                  | 1726                                                       | 2440                                                             | 1740                                                                                | 3700                                  |
| Enonyl Reduktase            | 7,9                                                   | 2390                                                       | 7,5                                                              | 2500                                                                                | 1460                                  |
| Dehydratase                 | 11,0                                                  | 7,5                                                        | 12                                                               | 36,7                                                                                | 47                                    |
| $\beta$ -Ketoacyl Synthase  | -                                                     | 13,0                                                       | 3,8                                                              | 12,5                                                                                | 10,5                                  |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | 950                                                   | 7,5                                                        | 475                                                              | 4,9                                                                                 | 16,3                                  |
|                             |                                                       | 50                                                         |                                                                  | 550                                                                                 | 2920                                  |

Tab. 15: Intragene in vitro Komplementation zwischen zwei isofunktionellen defekten fas2 Mutanten-Enzymen

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben.

| Enzym Funktionen            | Enzym - Aktivitäten                                  |                                                                     |                                                     |                                                                          |                   |                   |              |
|-----------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|--------------|
|                             | $\frac{\text{fas2-2562}}{(\text{pantethein- frei})}$ | $\frac{\text{fas2-2855}}{(\beta\text{-Ketoacyl-Synthase negativ})}$ | $\frac{\text{fas2-2562} + \text{fas2-2855}}{(1:1)}$ | $\frac{\text{fas2-2562} + \text{fas2-2855}}{\text{diss.-reass.diploid}}$ | $\frac{2562a}{x}$ | $\frac{2562a}{x}$ | Wildtyp      |
|                             |                                                      |                                                                     |                                                     |                                                                          | 2855x             | 2855x             | SC 167       |
|                             |                                                      |                                                                     |                                                     |                                                                          |                   |                   | diss.-reass. |
|                             |                                                      |                                                                     |                                                     |                                                                          |                   |                   | diss.-reass. |
| m Einheiten / mg            |                                                      |                                                                     |                                                     |                                                                          |                   |                   |              |
| Gesamt Reaktion             | -                                                    | -                                                                   | -                                                   | 177                                                                      | 163               | 122               | 690          |
| Acetyl Transferase          | 1205                                                 | 618                                                                 | 905                                                 | 777                                                                      | 857               | 608               | 980          |
| Malonyl Transferase         | 1322                                                 | 1700                                                                | 1580                                                | 1550                                                                     | 1200              | 909               | 3700         |
| Palmityl Transferase        | 2480                                                 | 2500                                                                | 2500                                                | 2465                                                                     | 2480              | 2500              | 1460         |
| Enonyl Reduktase            | 18                                                   | 13                                                                  | 15                                                  | 13,3                                                                     | 15                | 35,3              | 47           |
| Dehydratase                 | 15                                                   | 17                                                                  | 16                                                  | 13,7                                                                     | 21,3              | 30                | 10,5         |
| $\beta$ -Ketoacyl Synthase  | -                                                    | -                                                                   | -                                                   | 1,95                                                                     | 1,6               | 1,2               | 16,3         |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | 2740                                                 | 1618                                                                | 2190                                                | 2928                                                                     | 2987              | 2555              | 2920         |

Die Gesamt- und Teilaktivitäten der verschiedenen reinen Ausgangsenzyme der jeweiligen 1 : 1 Gemische und die der reassozierten Hybridenzyme gehen aus Tab. 14 und Tab. 15 hervor.

Man sieht, daß auch hier eine einfache Mischung der intakten Enzyme keinerlei Einfluß auf die negative Gesamtaktivität hat. Dagegen besitzt das durch Dissoziation und Reassoziation des Enzymgemisches erhaltene Hybridenzym wieder deutliche Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität. Für das Mutanten-Paar fas2-2562 / fas2-2855 wurde nicht nur der in vitro gebildete Hybridkomplex untersucht, sondern es wurde auch der in einer entsprechenden diploiden Zelle in vivo synthetisierte Einzelkomplex isoliert und ebenfalls enzymatisch charakterisiert. Die hierbei erhaltenen Werte sind zum Vergleich in Tab. 15 auch aufgeführt. Offensichtlich wurde in keinem dieser Fälle von intragener Komplementation, weder in vivo noch in vitro, ein Hybridkomplex mit voller Wildtypaktivität synthetisiert. Die Gesamtaktivität der Hybridenzyme lag zwischen 17 und 25 Prozent der spezifischen Aktivität des Wildtypenzym. Ein Vergleich mit dem Enzym der diploiden Zelle, welches ebenfalls nur 23 Prozent Wildtypaktivität aufwies, zeigt, daß es sich dabei nicht um eine experimentell

bedingte nicht-optimale Reassoziation der Untereinheiten handeln kann. Vielmehr dürfte die Tatsache eine Rolle spielen, daß bei der Rekombination zweier  $\alpha$ -defekter Komplexe - anders als bei der unter a) beschriebenen Rekombination eines  $\alpha$  - und eines  $\beta$ -defekten Enzyms - sich keine  $\alpha\beta$ -Kombination aus völlig ungeschädigten Untereinheiten bilden kann. Es ist bekannt, daß die sogenannte intragene Komplementation gewöhnlich zu keiner vollständigen Reaktivierung der geschädigten Funktion führt (110). Schließlich zeigten die Werte in Tab. 14 und 15 auch, daß ebenso wie im vorangegangenen Versuch die spezifischen Teilaktivitäten der Hybridenzyme sehr gut mit den entsprechenden Werten der reinen Mutantenenzyme übereinstimmen. Beim Vorliegen intensiver Protein-Protein Wechselwirkungen im Komplex und ihrer Beeinflussung durch die betreffenden Mutationen wäre dies nicht zu erwarten gewesen.

Bei dem Mutanten-Paar fas2-2562 / fas2-2855 ist es offensichtlich die ungenügende Reaktivierung des ursprünglich in beiden Mutanten defekten kondensierenden Enzyms, welche für die Minderung der Gesamtaktivität verantwortlich ist. In allen hier untersuchten Mutantenenzymen, auch in dem aus der

diploiden Zelle, war die Malonyl-Transferase nur halb so aktiv wie in der Wildtypsynthetase. Da jedoch die Gesamtaktivität um wesentlich mehr als 50 % reduziert ist, handelt es sich bei dieser Gesamtaktivitätsminderung sicher nicht um einen Malonyltransferase-bedingten Effekt.

- (c) Herstellung von Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Apoenzymen durch in vitro Rekombination geeigneter fas2-Mutantenenzyme

Bestimmte fas2-Mutanten synthetisieren einen Pantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplex (86). Bis auf eine Ausnahme (fas2-2562) gehören alle derartigen Mutanten derselben Komplementationsgruppe an (Gruppe VII). Da die Pantethein-freie Mutante fas2-2562 zur Komplementationsgruppe X gehört, komplementiert sie gut mit allen Mutanten der Gruppe VII. Darüberhinaus zeigen jedoch auch einige Vertreter der Gruppe VII untereinander, zumindest in vivo ein mehr oder weniger gut ausgeprägtes positives Komplementationsverhalten.

Führt man mit gereinigten, Pantethein-freien Fettsäuresynthetasen aus solchen in vivo komple-

mentierenden Mutanten im Reagensglas Rekombinationsexperimente durch, so ist zu erwarten, daß sich hierbei im Gegensatz zu allen bisher erwähnten Komplementationsversuchen kein funktionsfähiger Enzymkomplex zurückbildet: Der sich in vitro bildende Hybridkomplex wird in Abwesenheit eines Pantethein-einbauenden Systems immer noch Pantethein-frei sein, obwohl es im Gegensatz zu den homogenen Ausgangsenzymen grundsätzlich zur Aufnahme des Cofaktors in der Lage sein sollte. In der lebenden Zelle wird Pantethein in das Hybridenzym eingebaut weil die dafür notwendige Coenzym A: Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase ebenso wie das Coenzym A im Cytoplasma vorhanden sind.

Tab. 16 - 18 enthalten die in vitro- und zum Teil auch die in vivo Komplementationsdaten paarweiser Kombinationen von 5 verschiedenen Pantethein-freien fas2-Mutanten. Vier der Mutanten (fas2-158, fas2-655, fas2-750 und fas2-1322) stammen aus Komplementationsgruppe VII (vgl. Fig.3). Alle Mutanten komplementieren sich gegenseitig in vivo in den in Tab. 15 - 17 angeführten paarweisen Kombination (vgl. Fig. 19). Für zwei Kombinationen (fas2-750 / fas2-655 und fas2-1322 / fas2-2562) ist dies zusätzlich auch noch anhand der Gesamt-

Tab. 16: In vivo und in vitro Komplementation zwischen Panthein-freien Mutanten-Enzymen aus zwei verschiedenen fas2-Komplementationsgruppen

Experimentelle Einzelheiten wie in Material und Methoden beschrieben.

| Enzym Funktion              | Enzym - Aktivitäten |                  |                                                                    |                                                                                     |                                                                                            |         |
|-----------------------------|---------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
|                             | <u>fas2-1322</u>    | <u>fas2-2562</u> | $\frac{\text{fas2-1322}}{+}$<br>$\frac{\text{fas2-2562}}{(1 : 1)}$ | $\frac{\text{fas2-1322}}{\times}$<br>$\frac{\text{fas2-2562}}{\text{diss.-reass.}}$ | $\frac{\text{fas2-1322}\alpha}{\times}$<br>$\frac{\text{fas2-2562}\alpha}{\text{diploid}}$ | Wildtyp |
| Gesamt Reaktion             | -                   | -                | m                                                                  | Einheiten / mg                                                                      |                                                                                            |         |
| Acetyl Transferase          | 297                 | 712              | 550                                                                | 450                                                                                 | 660                                                                                        | 710     |
| Malonyl Transferase         | 1400                | 1700             | 1550                                                               | 1500                                                                                | 809                                                                                        | 593     |
| Palmityl Transferase        | 2400                | 2520             | 2500                                                               | 2500                                                                                | 1216                                                                                       | 3378    |
| Enoyl Reduktase             | 11,75               | 19,1             | 16,0                                                               | 28,3                                                                                | 2390                                                                                       | 1233    |
| Dehydratase                 | 19,6                | 17,5             | 18                                                                 | 18,5                                                                                | 14,5                                                                                       | 19,4    |
| $\beta$ -Ketoacyl Synthase  | -                   | -                | -                                                                  | -                                                                                   | 16,9                                                                                       | 12,3    |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | 2214                | 2996             | 2550                                                               | 1961                                                                                | 8,8                                                                                        | 16,0    |
|                             |                     |                  |                                                                    |                                                                                     | 3296                                                                                       | 1797    |

Tab. 17: In vivo und in vitro Komplementation zwischen Pantethein-freien Mutanten-Enzymen aus derselben fas2-Komplementationsgruppe (VII)

Experimentelle Einzelheiten wie in Material und Methoden beschrieben.

| Enzym Funktion       |      | Enzym - Aktivität                        |                                          |                                                    |                                                         |                                                                      |
|----------------------|------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
|                      |      | <u>fas2-750</u><br>(panthetein-<br>frei) | <u>fas2-655</u><br>(panthetein-<br>frei) | <u>fas2-750</u><br>+<br><u>fas2-655</u><br>(1 : 1) | <u>fas2-750</u><br>x<br><u>fas2-655</u><br>diss.-reass. | <u>2-750<sub>a</sub></u><br>x<br><u>2-655<sub>a</sub></u><br>diploid |
|                      |      | m Einheiten / mg                         |                                          |                                                    |                                                         |                                                                      |
| Gesamt Reaktion      | -    | -                                        | -                                        | -                                                  | -                                                       | 310                                                                  |
| Acetyl Transferase   | 940  | 686                                      | 810                                      | 850                                                | 604                                                     | 7810                                                                 |
| Malonyl Transferase  | 8640 | 5320                                     | 6950                                     | 7500                                               | 3300                                                    | 16,9                                                                 |
| Palmityl Transferase | 4250 | 2545                                     | 3390                                     | 43                                                 | 24                                                      | 16,4                                                                 |
| Enonyl Reduktase     | 31,6 | 21,8                                     | 26,5                                     | -                                                  | 8,2                                                     | 2935                                                                 |
| Dehydratase          | 32,2 | 21                                       | 26,5                                     | -                                                  | -                                                       | -                                                                    |
| β-Ketoacyl Synthase  | -    | -                                        | -                                        | -                                                  | -                                                       | -                                                                    |
| β-Ketoacyl Reduktase | 2093 | 2348                                     | 2215                                     | 2215                                               | 2215                                                    | 2215                                                                 |

Tab. 18: In vitro Komplementation zwischen Pantethein-freien Mutanten-Enzymen aus der-  
selben Komplementationsgruppe (VII).

Experimentelle Durchführung wie in Material und Methoden beschrieben.

| Enzym Funktion              | Enzym - Aktivitäten |                 |                                                      |                                                         |
|-----------------------------|---------------------|-----------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                             | <u>fas2-750</u>     | <u>fas2-158</u> | <u>fas2-750</u><br>+<br><u>fas2-158</u><br>( 1 : 1 ) | <u>fas2-750</u><br>+<br><u>fas2-158</u><br>diss.-reass. |
| m Einheiten / mg            |                     |                 |                                                      |                                                         |
| Gesamt Reaktion             | -                   | -               | -                                                    | -                                                       |
| Acetyl Transferase          | 940                 | 578             | 750                                                  | 890                                                     |
| Malonyl Transferase         | 8640                | 7240            | 7900                                                 | 7650                                                    |
| Palmityl Transferase        | 4250                | 3390            | 3800                                                 | 3900                                                    |
| Enonyl Reduktase            | 31,6                | 18,2            | 25,0                                                 | 25                                                      |
| Dehydratase                 | 32,2                | 26              | 29                                                   | 42                                                      |
| $\beta$ -Ketoacyl Synthase  | -                   | -               | -                                                    | -                                                       |
| $\beta$ -Ketoacyl Reduktase | 2093                | 2780            | 2390                                                 | 3740                                                    |

aktivität der aus den entsprechenden Diploiden isolierten Fettsäuresynthetasen gezeigt ( Tab. 16 und 17 ). Im Gegensatz zu den in vivo synthetisierten Diploiden-Enzymen sind die in vitro gebildeten Hybridenzyme jedoch wie erwartet in allen 3 untersuchten Untereinheiten-Kombinationen weiterhin defekt in der Pantethein-abhängigen kondensierenden Teilreaktion und damit auch in der Fettsäuresynthetase-Gesamtreaktion (Tab. 16 - 18) .

Die drei so hergestellten Pantethein-freien Apo-Fettsäuresynthetasen wurden in den im folgenden beschriebenen Versuchen zur Charakterisierung des Enzym Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase benutzt.

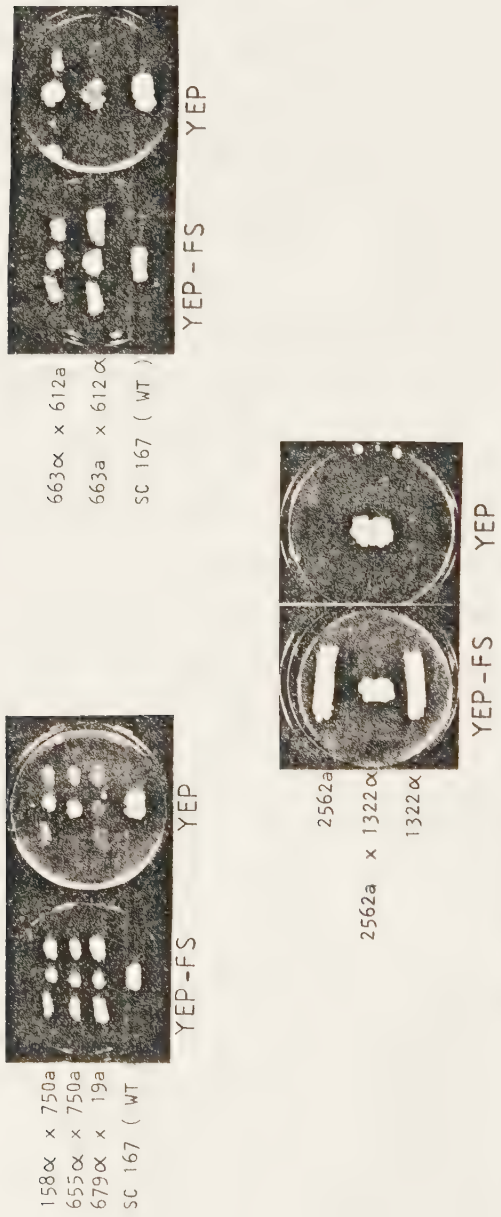


Fig. 19: In vivo Komplementation zwischen Pantethein-freien fas2-Mutanten der Komplementationsgruppen VII und X.

Zur Durchführung der Komplementationsanalyse vgl. Material und Methoden bzw. Fig. 18

7. Nachweis von CoA: Apo-ACP O-Phosphatpantethein-  
transferase Aktivität im Zellextrakt von Hefe

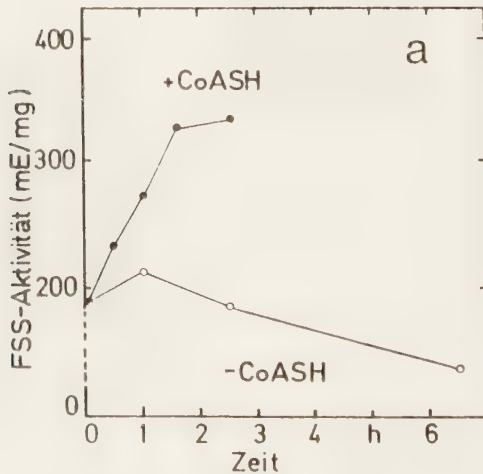
Trotz Untersuchung einer sehr großen Zahl (>10.000) Fettsäure-bedürftiger Hefemutanten war es im hiesigen Institut bisher nicht gelungen, das für die Biosynthese eines aktiven FSS-Komplexes nötige, vorläufig jedoch hypothetische, Enzym Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase an Hand spezifischer Defekt-Mutanten nachzuweisen. Nach der im vorausgehenden Kapitel beschriebenen Darstellung von FSS-Apoenzymen konnte jedoch der Nachweis einer entsprechenden Transferase-Aktivität mit biochemischen Methoden versucht werden.

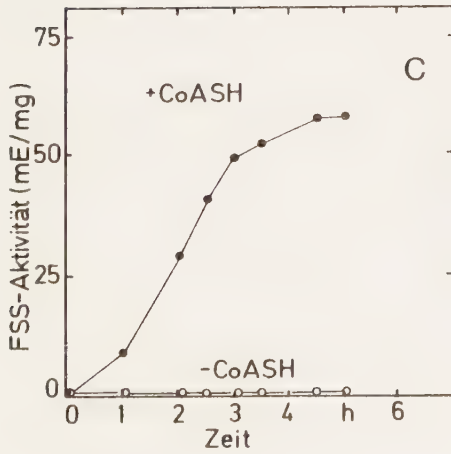
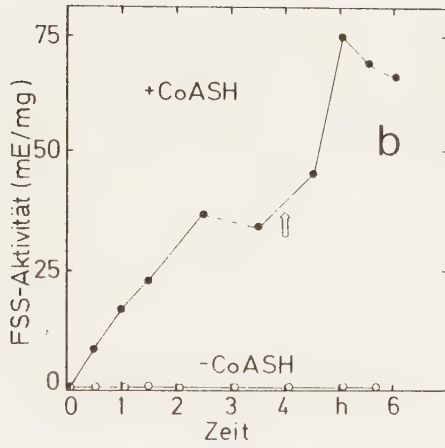
Unter Verwendung von Coenzym A als Phosphopantethein-Donator und dem Zellextrakt einer CRM-negativen fas-Mutante als Transferase-Präparat wurde versucht, enzymatisch inaktives Apoenzym zu einem in der Gesamtreaktion aktiven Holoenzym zu aktivieren. Dieser Vorgang wurde an Hand einer Reihe von Proben, die zu verschiedenen Zeitpunkten der Inkubationslösung entnommen wurden, zeitlich verfolgt. Die in Fig. 20 gezeigten Kinetiken belegen, daß es mit dieser Methode tatsächlich gelingt, alle 3 untersuchten Apoenzyme zu aktivieren. Man

Fig. 20 a-c: Aktivierung Pantethein-freier, hybrid zusammengesetzter Fettsäuresynthetasen durch Heferohextrakt in Gegenwart von Coenzym A

Der Aktivierungsansatz enthielt: 12 mg Rohextraktkonzentrat (117) der Deletionsmutante *fas1-3410* *ura<sup>-</sup>* (116) als Transferase Präparation, 0,8 mg Apo-Fettsäuresynthetase, 100  $\mu$ Mole  $MgCl_2$ , CoA, 100  $\mu$ Mole DTT, 0,1 mMol Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Testansätze (●) enthielten in (a) und (c) jeweils 100, in (b) zunächst 50 nMole Coenzym A, zu denen später (Pfeil) weitere 50 nMole hinzugefügt wurden. Die Kontrollen (○) waren bis auf die Abwesenheit von Coenzym A mit den Testansätzen (●) identisch. Ihnen wurden bei 25° C zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und deren Gesamt-Fettsäuresynthetaseaktivität bestimmt.

- (a) Apoenzym aus *fas2-1322* x *fas2-2562*
- (b) Apoenzym aus *fas2- 750* x *fas2- 158*
- (c) Apoenzym aus *fas2- 750* x *fas2- 655*





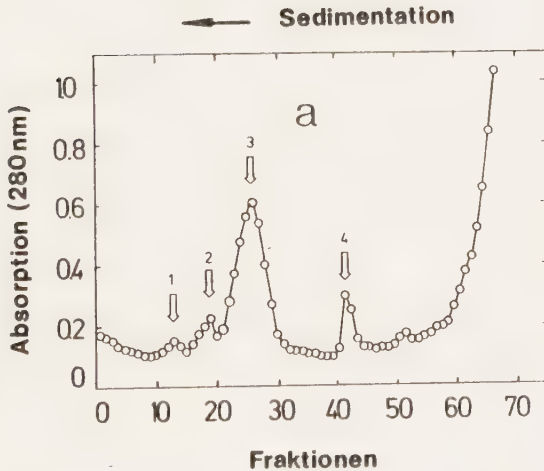
sieht deutlich, daß für die Reaktion Coenzym A unbedingt nötig ist. ATP erwies sich dagegen als entbehrlich (117) (nicht gezeigt).

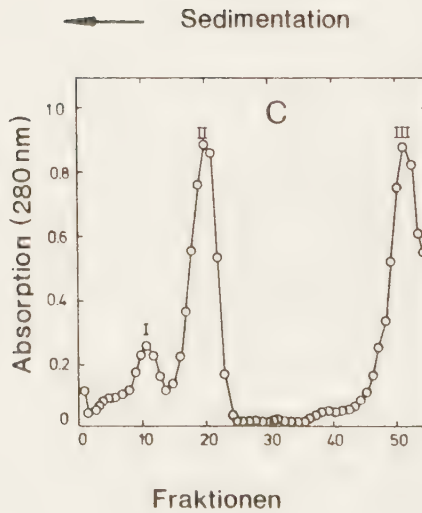
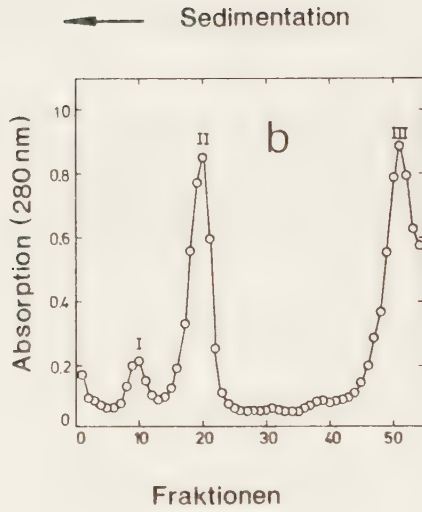
Das fas2-1322 / fas2-2562 Hybridenzym besaß auch schon vor Beginn der Phosphopantethein-Beladung eine nicht zu übersehende Gesamtaktivität (vgl. Fig. 20 a). Dies mag darauf zurückzuführen sein, daß eine der beiden beteiligten fas-Mutanten (fas2-1322) gelegentlich einen Enzymkomplex mit bis zu 25 % Wildtypaktivität synthetisiert. Die Ursache hierfür wurde nicht weiter untersucht, sie liegt sicher nicht in einer gelegentlichen Verunreinigung der Kulturen mit Revertanten begründet. Überhaupt lieferte die fas2-1322 / fas2-2562 Mutanten-Kombination in verschiedenen Experimenten nur unbefriedigende reproduzierbare Ergebnisse: Ein zweiter Versuch mit neu isolierten Ausgangsenzymen derselben Mutanten ergab im Gegensatz zum ersten Versuch keine vergleichbare Aktivierbarkeit des Hybridenzym zur Holo-Fettsäuresynthetase (nicht gezeigt). Aus Fig. 20 a geht weiterhin hervor, daß die maximal erreichbare Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität in vitro hergestellten fas2-1322 / fas2-2562 Holo-Enzyms nur ca. 30 % des in vivo beobachteten Wertes beträgt (vgl. Tab. 16).

Fig. 21 a-c: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation von reassozierten Pantethein-freien Hybrid-Fettsäuresynthetasen nach DMMA-Spaltung

Experiment. Einzelheiten wie in Material und Methoden beschrieben. Fraktionsvolumen 0,8 ml

- a = Hybrid-FSS aus fas2-1322 und fas2-2563
- b = Hybrid-FSS aus fas2- 750 und fas2- 158
- c = Hybrid-FSS aus fas2- 750 und fas2- 655





Möglicherweise wird in vivo nicht erst das  $\alpha_6\beta_6$  Hexamere, sondern schon eine niedrigere Assoziationsstufe des Komplexes mit Phosphopantethein beladen, und in dem in vitro hergestellten intakten hexameren Apoenzym können nicht mehr alle dafür vorgesehenen Positionen mit Phosphopantethein besetzt werden. Allerdings war es in dieser Arbeit nicht möglich, schon die unassoziierten - seien es die mit DMMA modifizierten oder die freien Fettsäuresynthetase-Untereinheiten - mit Phosphopantethein zu beladen (nicht gezeigt). Diese oben diskutierte Frage muß daher vorerst offen bleiben.

Interessanterweise ergaben sich bei der Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation der reassozierten Phosphopantethein-freien Fettsäuresynthetase-Komplexe in reproduzierbarer Weise Sedimentationsprofile, die sich von den bei reassoziierter Holo-Fettsäuresynthetase üblichen Profilen durch die Anwesenheit zusätzlicher Gipfel unterschieden. Dies ist aus Fig. 21 ersichtlich, in der bei allen drei in dieser Arbeit untersuchten Fettsäuresynthetase-Apoenzymen (vgl. Tab. 16 - 18) zusätzlich zum normalen Fettsäuresynthetase-Gipfel (Nr. 3 bzw. II) eine bis drei weitere Fettsäuresynthetase-Komponenten in Erscheinung treten. Diese Begleit-Komponenten

sind gewöhnlich schwerer als das  $\alpha_6\beta_6$ -Hexamere, im ersten Fall tritt jedoch auch eine leichtere Komponente auf (Nr. 4 in Fig. 21 a). Bei der Paarung fas2-1322 / fas2-2562 (Fig. 21 a) handelte es sich um die Kombination zweier Mutantenenzyme, von denen eines (fas2-1322) schon von vornherein eine geringe noch meßbare Gesamt-Fettsäuresynthetaseaktivität besaß. Dementsprechend konnte das Hybrid-Apoenzym auch schon ohne Coenzym A und Transferasepräparat auf Fettsäuresynthetase-Aktivität untersucht werden. Es zeigte sich dabei, daß in Fig. 21 a die Fraktionen 1 - 3 alle eine gleich hohe spezifische Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität besaßen (Tab. 19) während bei Fraktion 4 die Fettsäuresynthetase-Aktivität erst durch nochmalige Zugabe von FMN meßbar wurde. Die Begleitproteine der beiden anderen Hybrid-Apoenzyme (Nr. I in Fig. 21 b und c) besaßen zwar ebenso wie die Hauptfraktionen (Nr. II) keine Fettsäuresynthetase-Gesamtaktivität, jedoch eine ähnliche spezifische Aktivität wie die Hauptfraktionen wenn eine Pantethein-unabhängige Fettsäuresynthetase-Teilaktivität ( $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase) getestet wurde (Tab.19). Die unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeit der verschiedenen Komponenten dürfte entweder auf einen unterschiedlichen Assoziationsgrad der  $(\alpha\beta)_n$

Tab. 19: Spezifische Enzymaktivitäten in verschiedenen bei der Bildung hybrider Apoenzyme auftretenden Pantethein-freien Assoziationsprodukten

Bezüglich Herstellung und Eigenschaften der einzelnen Hybridenzyme und ihrer Komponenten vgl. Fig. 21.

| Hybrid-<br>Apoenzym                 | Protein<br>Komponente | Spezifische-Aktivität |                                 |
|-------------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                                     |                       | Gesamt-<br>reaktion   | $\beta$ -Ketoacyl-<br>Reduktase |
| mE / mg                             |                       |                       |                                 |
| <u>fas2-1322</u> x <u>fas2-2562</u> | 1                     | 278                   | 2890                            |
|                                     | 2                     | 49                    | 890                             |
|                                     | 3                     | 162                   | 2590                            |
|                                     | 4                     | -                     | 115                             |
| <u>fas2-750</u> x <u>fas2-158</u>   | I                     | -                     | 3074                            |
|                                     | II                    | -                     | 3742                            |
| <u>fas2-750</u> x <u>fas2-655</u>   | I                     | -                     | 2084                            |
|                                     | II                    | -                     | 2214                            |

Obligomeren oder auf die Bildung Konformationsisomerer ( $\alpha\beta_6$ )-Komplexe zurückzuführen sein. Die vergleichbaren Enzymaktivitäten aller Fraktionen sprechen eher für die erstgenannte Möglichkeit. Die Frage wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Offensichtlich handelt es sich jedoch bei dieser ungewöhnlichen Assoziatbildung um eine spezifische Eigenschaft der Phosphopantethein-freien Untereinheiten des Fettsäuresynthetase-Komplexes. Dieses könnte darauf hindeuten, daß der Phosphopantethein-Gruppe in der  $\alpha$ -Untereinheit des Komplexes neben ihrer funktionellen Bedeutung im Reaktionsprozeß auch noch eine strukturelle Rolle bei der Ausbildung einer definierten Quarternärstruktur des Komplexes zukommt.

C. Methodische Verbesserungen zur Fettsäuresynthetase-  
Isolierung aus Hefe

---

Die Isolierung des Fettsäuresynthetase-Komplexes aus Hefe erfolgte zunächst nach der im Lynen'schen Laboratorium ausgearbeiteten Methode (61). Allerdings wurden im Verlauf dieser Arbeit einige methodische Abänderungen gefunden, welche sowohl den Reinigungsprozeß zu beschleunigen wie auch die Enzymausbeute zu steigern vermögen. Im einzelnen waren dies:

1. Zellaufschluß durch Einfrieren in flüssigem  
Stickstoff (112)

---

Der Aufschluß von Hefezellen mit Glasperlen in einem Zellhomogenisator nach Merckenschlager, Schlossmann und Kurz (109) ist für größere Mengen Hefe umständlich. Ein Aufschluß der Hefezellen über die Druckentlastung, welcher ohne weiteres mit Kilogramm-Mengen durchgeführt werden kann, erbringt jedoch eine schlechte Enzymausbeute, da die Fettsäuresynthetase offenbar bei Drücken über 600 atm. zerfällt oder in anderer Weise inaktiviert wird. Es war jedoch

bekannt, daß sich aus Hefezellen durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen ein Zellextrakt zur Enzymgewinnung herstellen läßt (111). Hierbei handelt es sich um eine besonders schonende Methode, da die platzenden Hefezellen keiner mechanischen Beanspruchung ausgesetzt sind. Eine Anwendung dieser Methode für die Fettsäuresynthetase-Isolierung ergab, daß einmal die Zellen besonders rasch und in sehr guter Ausbeute aufgeschlossen wurden und zum anderen die Fettsäuresynthetase-Aktivität im Extrakt nicht geringer war als beim Aufschluß mit Glasperlen. Aus Fig. 22 geht hervor, daß beide Aufschlußmethoden zu Präparaten mit gleichem Sedimentationsverhalten im Rohrzuckerradianten und mit vergleichbarer Reinheit führten. Weiterhin war die spezifische Aktivität der gereinigten Fettsäuresynthetase in beiden Fällen praktisch dieselbe (1200 mE / mg und 1180 mE / mg), obwohl die mit flüssigem Stickstoff aufgeschlossenen Hefezellen nach dem Einfrieren noch weitere 14 Tage bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert worden waren. Die Lagerung als solche erwies sich jedoch als für den Erfolg der Enzymreinigung nicht notwendig.

## 2. Polymin P-Fraktionierung

Die Fettsäuresynthetase-Isolierung aus geringen Zellmengen, wie sie etwa bei der Gewinnung von Mutantenzymen notwendig ist, wird vor allem bei den letzten Reinigungsschritten durch die Anwesenheit größerer Mengen einer glasig-weißlichen, UV-absorbierenden Substanz behindert. Diese läßt sich nur durch wiederholte, jeweils 6-stündige Zentrifugation bei 100.000 x g und anschließender Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation vom Enzymprotein abtrennen (vgl. Fig. 4). Es wurde gefunden, daß diese Verunreinigung durch Behandlung der rohen Zellextrakte mit käuflichem Polyäthylenimin (monomer, "Polymin P") wirkungsvoll und unter voller Erhaltung der Fettsäuresynthetase-Aktivität entfernt werden können. Auch bei der Reinigung anderer Enzyme wurde diese Methode erfolgreich angewandt (113).

"Polymin P" ist sehr basisch und fällt bevorzugt saure Moleküle (z.B. Nukleinsäuren, Nukleoproteine und saure Proteine) aus. Der zur Entfernung der Verunreinigungen nötige Polymin P-Zusatz zum Rohextrakt richtet sich nach der jeweiligen Salzkonzentration sowie nach der Menge vorhandener

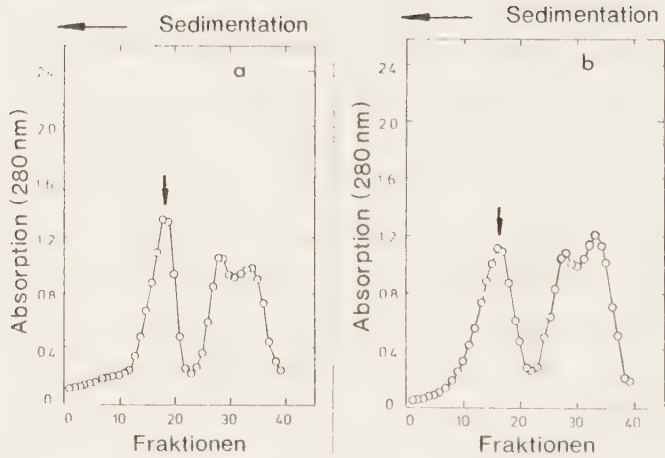


Fig. 22 a-b: Rohrucker-Dichtegradientenzentrifugation gereinigter Fettsäuresynthetase-Präparationen (Pfeil) aus Bäckerhefe, welche ein Mal mit Glasperlen (a), das andere Mal mit flüssiger Luft (b) aufgeschlossen worden war.

Einzelheiten der Enzymreinigung vgl. Material und Methoden

Nukleinsäuren und Proteine. Auch die Fettsäuresynthetase kann mit hohen Polymin P-Konzentrationen ausgefällt werden (vgl. Fig. 23). Somit ist es notwendig, bei jeder Fettsäuresynthetase-Isolierung vor der Hauptfällung eine Probe des Rohextraktes mit Polymin P zu titrieren. Zwei derartige Titrationen sind in Fig. 23 für die Extrakte zweier verschiedener Hefestämme gezeigt.

### 3. Verwendung eines Vertikalrotors zur Rohrzucker- Dichtegradientenzentrifugation

In den letzten Jahren kamen neuentwickelte sog. Vertikalrotoren auf den Markt, welche alternativ zu den herkömmlichen Ausschwingrotoren in präparativen Ultrazentrifugen eingesetzt werden können (114). Ihr Vorteil besteht in einer wesentlichen Zeitersparnis (2 statt 15 Stunden Zentrifugationsdauer) sowie zusätzlich in einer noch besseren Trennschärfe der verschiedenen Komponenten im Gradienten. Ein Vergleich der Sedimentationsprofile derselben Enzympräparation, die ein Mal im herkömmlichen Ausschwingrotor und das andere Mal im Vertikalrotor erhalten wurden, ist in Fig. 24 gezeigt.

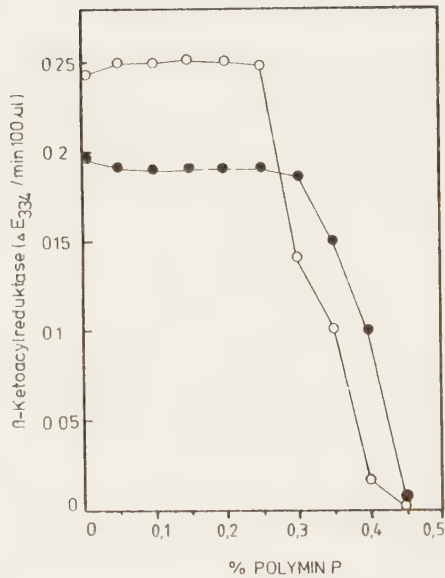


Fig. 23: Fällung von Fettsäuresynthetase mit Polymin P aus dem Zellextrakt von Bierhefe (o) und Wild-typ SC 167 (●)

Polymin P wurde zu 1 ml-Proben als 10 %ige (g/v) Lösung (pH 6,0) unter kräftigem Mischen zugegeben. Der entstehende Niederschlag wird sofort 10 min bei 25.000 xg (15 ml Corex Glas) abzentrifugiert und in einem Aliquot des Überstandes die Enzymaktivität bestimmt (vgl. Material und Methoden).

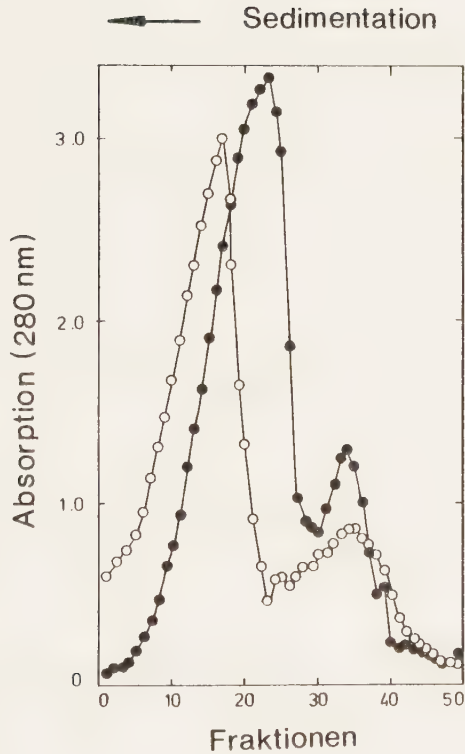


Fig. 24: Rohrzucker-Dichtegradientenzentrifugation von gereinigter Fettsäuresynthetase im Ausschwingrotor SW 27 (●) und im Vertikalrotor TV 850 (○).

Auf die Gradienten wurden je Röhrchen 30 mg Protein (1 ml) aufgesetzt. Fraktionsvolumen 0,7 ml. SW 27 Lauf: 15 h bei 23.000 UpM und 4° C. Gradient 10 - 25 % (g/g) Saccharose in 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 6,5, 1 mM DTT, 10 mM EDTA. TV 850 Lauf: 2 h bei 45.000 UpM und 4° C. Gradient 10 - 30 % (g/g) Saccharose in 0,1 M Kalium Phosphatpuffer pH 6,5, 1 mM DTT, 10 mM EDTA.

In Tab. 20 wird ein typisches Anreicherungs-Schema des Fettsäuresynthetase-Komplexes aus Hefe gezeigt, wie es sich nach der Einführung der erwähnten methodischen Veränderungen darstellt. Es werden auf diese Art Enzympräparationen mit einer spezifischen Aktivität von 1428 mE/mg (bei 25° C mit Modellsubstraten N-Capryl-S-Malonyl-Cysteamin und N,S-Diacetyl-Cysteamin) erhalten. Das entspricht einer 257-fachen Anreicherung gegenüber dem Rohextrakt. Die Aktivitätsbestimmung bei 37° C erbringt für die spezifische Aktivität einen Wert von 2232 mE/mg.

4. Abhängigkeit des Fettsäuresynthetase-Gehaltes von der Hefesorte und von den Anzuchtbedingungen der Hefe
- 

Zur Isolierung von Wildtyp FSS wurden von uns teils käufliche Bäckerhefe (Hefefabrik Bast, Nürnberg) teils frische Bierhefe (Kitzmann Brauerei, Erlangen) teils selbst gezüchtete haploide und diploide, genetisch definierte Sacch.cerevisiae Stämme benutzt. Die dabei enthaltenen hochgereinigten FSS-Präparationen unterscheiden sich voneinander weniger in ihren spezifischen Gesamt- und Teilaktivitäten als in den jeweils erzielbaren Enzymaus-

Tab. 20: Reinigungsschema des Fettsäuresynthetase-Komplexes

Zur Bestimmung der Teilaktivitäten mit Modellsubstraten vgl. Material und Methoden

| Fraktion                                             | Volumen | Gesamt-<br>aktivität | Gesamt-<br>protein | Spezifische<br>Aktivität | Anreiche-<br>rungsfaktor | Gesamt-<br>Ausbeute |
|------------------------------------------------------|---------|----------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------|
|                                                      | ml      | Einheiten            | mg                 | mE / mg                  |                          | %                   |
| Rohextrakt                                           | 1800    | 310                  | 45.000             | 7                        | -                        | 100                 |
| Polymin P-Fällung                                    | 1675    | 310                  | 10.000             | 30                       | 4,5                      | 100                 |
| 1. Ammoniumsulfatfällung<br>Überstand                | 1850    | 284                  | 5.000              | 60                       | 9                        | 91,6                |
| 2. Ammoniumsulfatfällung<br>Niederschlag aufgenommen | 205     | 274                  | 3.587              | 76                       | 12,5                     | 88,3                |
| Calciumphosphat-Gel<br>Überstand                     | 285     | 275                  | 2.290              | 120                      | 19,7                     | 88,7                |
| 1. Ammoniumsulfatfällung<br>Überstand                | 304     | 254                  | 1.890              | 134                      | 23,8                     | 81,9                |
| 2. Ammoniumsulfatfällung<br>Niederschlag aufgenommen | 32      | 254                  | 1.460              | 173                      | 30,8                     | 81,9                |
| 30 min 100.000 x g                                   | 36      | 254                  | 820                | 310                      | 54,9                     | 81,9                |
| 12 h 100.000 x g<br>Niederschlag aufgenommen         | 10      | 254                  | 368                | 690                      | 122,3                    | 81,9                |
| 6 h 100.000 x g<br>Niederschlag aufgenommen          | 8       | 252                  | 188                | 1.340                    | 239,3                    | 81,2                |
| Zuckergradient                                       | 45      | 250                  | 175                | 1.428                    | 254                      | 80,6                |

beuten, bezogen auf Feuchtmasse Ausgangsmaterial (vgl. Tab. 21).

Die höchsten Ausbeuten wurden bei Verwendung von Brauerei-Hefe, etwa 9 mal niedrigere bei käuflicher Bäckerhefe als Ausgangsmaterial erzielt. Die vorliegenden Daten lassen keinen Schluß darüber zu, ob es sich hierbei um Stamm- oder um Milieu-bedingte Unterschiede handelt. Immerhin war die Bierhefe praktisch anaerob, die Bäckerhefe aber unter extrem aeroben Bedingungen gewachsen. Weiterhin sprechen die Daten in Tab. 21 für einen deutlichen reprimierenden Effekt hoher Fettsäurenkonzentrationen auf den FSS-Gehalt von SC 167 Zellen. Frühere Untersuchungen von Meyer (115) hatten bei einem anderen Hefestamm (SC 9) keinen derartigen Effekt aufzeigen können. Es muß daher offen bleiben, ob es sich hier um einen in Hefe bedeutungsvollen, allgemein wirksamen Regulationseffekt von externen Fettsäuren auf die Biosynthese des FSS-Komplexes handelt.

Tab. 21: Reinigung von Fettsäuresynthetase aus verschiedenen Hefe-Sorten: Ausbeuten und spezifische Enzymaktivitäten

Experimentelle Einzelheiten zur Enzymreinigung und Aktivitäts-Bestimmung vgl. Material und Methoden. Alle Aktivitäten wurden mit Modellsubstraten bestimmt. (n.b. = nicht bestimmt)

| Hefesorte                     | Ausbeute aus<br>1 kg feuchter<br>Hefe | Anzucht-<br>bedingungen | Spezifische Enzymaktivitäten |                             |                              |                               |                          |                       |                                                                            |
|-------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|
|                               |                                       |                         | Gesamt-<br>aktivi-<br>tät    | Acetyl-<br>Trans-<br>ferase | Malonyl-<br>Transfe-<br>rase | Palmityl-<br>Transfe-<br>rase | Enoyl-<br>Reduk-<br>tase | Dehy-<br>dra-<br>tase | $\beta$ -Keto-<br>acyl-Syn-<br>thase<br>$\beta$ -Keto-<br>acyl-<br>Redukt. |
|                               | mg                                    |                         |                              |                             |                              | mE / mg                       |                          |                       |                                                                            |
| Bierhefe<br>polyploid         | 175                                   | gärend                  | 1428                         | 1230                        | 1200                         | 2500                          | 26                       | 13                    | 8 3200                                                                     |
| Bäckerhefe<br>polyploid       | 20                                    | atmend                  | 1200                         | n.b.                        | n.b.                         | n.b.                          | n.b.                     | n.b.                  | 2890                                                                       |
| SC 167<br>WT haploid          | 9                                     | (YEP-FS)<br>gärend      | 720                          | 647                         | 3477                         | 1370                          | 15,3                     | 14,5                  | 19 1750                                                                    |
| SC 167<br>WT haploid          | 94                                    | (YEP)<br>gärend         | 744                          | 593                         | 3378                         | 1233                          | 19,4                     | 12,3                  | 16 1797                                                                    |
| SC 9<br>WT haploid            | 110                                   | (YEP)<br>gärend         | 1100                         | n.b.                        | n.b.                         | n.b.                          | n.b.                     | n.b.                  | n.b. 3045                                                                  |
| SC 177 x SC 167<br>WT diploid | 105                                   | (YEP)<br>gärend         | 960                          | 809                         | 3215                         | 2390                          | 14,5                     | 16,9                  | 18,8 3295                                                                  |

#### IV. DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich grundsätzlich 3 verschiedenen Fragenkreisen zuordnen: der systematischen biochemisch-genetischen Untersuchung einer großen Zahl von Fettsäuresynthetase-Mutanten, der Rekonstruktion eines intakten Fettsäuresynthetase-Komplexes aus geeigneten mutierten bzw. Wildtyp-Untereinheiten sowie dem Nachweis des Enzyms Coenzym A: Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase in Heffe. Nachdem viele Einzelergebnisse dieser Arbeit bereits bei ihrer ersten Erwähnung im Ergebnisteil diskutiert wurden, soll in dieser abschließenden Diskussion nur noch eine grundsätzliche Wertung der Ergebnisse vorgenommen werden.

Die biochemisch-genetische Untersuchung von fas1- und fas2-Mutanten war mit dem Ziel unternommen worden, neue, bisher enzymatisch nicht charakterisierte Teilfunktionen des Fettsäuresynthetase-Komplexes aufzufinden. Weiterhin sollten dabei evtl. bestehende allosterische Wechselbeziehungen zwischen den verschiedenen katalytischen Domänen des Fettsäuresynthetase-Moleküls nachgewiesen werden. Tatsächlich wurde beides erreicht: es wurde die Acetaltransferase als eine fas1-kodierte Domäne identifiziert, es wurde auf der  $\beta$ -Untereinheit eine bisher unbekannte, für den Katalysemechanismus aber unentbehrliche SH-Gruppe gefunden, es wurden Hinweise für einen Komplex-internen Intermediat-Transfer - wahrscheinlich des  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigten Acylrestes - erhalten, und es wurden signifikante und regelmäßig zu beobachtende Protein-Protein-Wechselwirkungen, vor allem zwischen  $\beta$ -Ketoacylsynthetase und Enoyl-Reduktase sowie zwischen  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase und Dehydratase nachgewiesen. An den letztgenannten Effekten ist

besonders bemerkenswert, daß es sich hierbei um Domänen handelt, welche auf jeweils verschiedenartigen Untereinheiten des Komplexes lokalisiert sind. Man kann möglicherweise daraus folgern, daß an der Berührungsfläche von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten innerhalb des Fettsäuresynthetase-Moleküls die Domäne der  $\beta$ -Ketoacylsynthase zu einem kleineren Teil den Acyltransferasen und zu einem größeren Teil der Enoyl-Reduktase gegenübersteht, ebenso wie dies offenbar die Domänen der Dehydratase und der  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase tun. Für eine bessere Vorstellung vom molekularen Reaktionsablauf im Komplex läßt sich eine solche Annahme allerdings nur begrenzt auswerten. Überhaupt muß festgestellt werden, daß der Fettsäuresynthetase-Komplex sowohl hinsichtlich seiner molekularen Architektur wie auch bezüglich des detaillierten intramolekularen Reaktionsmechanismus weiterhin die "black box" bleibt, wobei die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse wohl erst zu einem späteren Zeitpunkt sich als Bausteine in das Mosaik eines zusammenhängenden und geordneten Gesamtbildes werden einfügen lassen.

Die Ergebnisse der Rekonstitutions-Experimente mit dissoziierten Fettsäuresynthetase-Untereinheiten sind in verschiedener Hinsicht bedeutungsvoll: einmal war es nicht von vornherein zu erwarten, daß die Rekombination von Wildtyp-Untereinheiten zu einem intakten Komplex sowohl bzgl. mengenmäßiger Ausbeute wie hinsichtlich des Umfanges der zurückerhaltenen Enzymaktivität in derart günstiger Weise abläuft. Dieser Befund schuf jedoch die Voraussetzung für eine gute Interpretierbarkeit der nachfolgenden Experimente mit mutierten Untereinheiten, bei denen hybride Enzymkomplexe gewonnen wurden. Soweit es sich hierbei um

defekte gleichartige (nicht gleichartig defekte !) Untereinheiten, also um sog. intragene Komplementation, handelte, sind hierfür trotz der Existenz einer umfangreichen genetischen Literatur (118) erst ganz wenige biochemische Versuche mit gereinigten Enzymen in der Literatur beschrieben (120). Der am besten dokumentierte Fall ist die in vitro-Bildung hybrider alkalischer Phosphate aus E.coli (121). Abgesehen von anderen Dissoziationsbedingungen sind die dort erzielten Ergebnisse mit den in dieser Arbeit erhaltenen Befunden gut vergleichbar: es bildeten sich enzymatisch aktive, hybride Oligomere aus verschiedenartig mutierten Untereinheiten mit einer gegenüber dem Wildtypenzym deutlich verringerten spezifischen Aktivität. Eine theoretische Deutung des vor allem in der Eukaryonten-Genetik sehr häufig beschriebenen Phänomens der intragenen Komplementation wurde einmal von Crick (110) und Orgel (119) in einer engeren und zum anderen von Ficham (110) in einer etwas weiter gefaßten Hypothese unternommen. Die Faltung der mutierten Untereinheiten erfolgt danach im wechselseitigen heterologen Kontakt anders als im homologen und zwar derart, daß in der heterologen Kombination (und nur in dieser !) wieder eine enzymatische aktive Konformation entsteht. In vitro Versuche der hier durchgeführten Art können zum Beweis dieser Hypothese allerdings wenig beitragen. Sie bestätigen lediglich in einem übersichtlichen in vitro System bekannter und definierbarer Zusammensetzung die Möglichkeit der Bildung aktiver hybrider Enzyme aus inaktiven Mutanten-Proteinen.

In einigen Fällen mag durch solche Rekombinations-Experimente ein Zugang zu speziellen proteinchemi-

schen Fragestellungen ermöglicht werden. So war es z.B. in dieser Arbeit nur mit Hilfe dieser in vitro-Rekombinationstechnik möglich, ein Fettsäuresynthetase-Apoenzym zu konstruieren, welches zur Aufnahme von Phospho-Pantetheinresten fähig und damit als Substrat für einen Coenzym A: Apo-ACP O-Phosphopantetheintransferase-Test verwendbar war. Nachdem z. Zt. auf keinem anderen praktikablen Weg ein solches Apoenzym zugänglich ist, war nur auf diese Weise die Voraussetzung zu einem direkten enzymchemischen Nachweis einer solchen Transferase-Aktivität in Hefe gegeben. Da keine Phosphopantetheintransferase-Mutanten isolierbar gewesen waren, schien es grundsätzlich denkbar, daß dieses Enzym ebenfalls ein integraler Bestandteil des Fettsäure-Synthetasekomplexes war. Diese Möglichkeit konnte jedoch durch die hier geschilderten Versuche ausgeschlossen werden: ein Fettsäuresynthetase-freier Zellextrakt hätte in diesem Fall keine Phosphopantetheintransferase-Aktivität aufweisen dürfen. Eine Anreicherung der Phosphopantethein-Transferase aus dem Zellextrakt und damit eine Untersuchung des Mechanismus der Holoenzymbildung mit gereinigten Reaktanten im Reagensglas erscheint auf der Grundlage dieser Befunde möglich.

## X. ZUSAMMENFASSUNG

Es werden in dieser Arbeit die biochemische Charakterisierung bestimmter, mutierter Fettsäuresynthetase-Komplexe der Hefe sowie in vitro Rekombinations-Experimente mit markierten Untereinheiten dieses Multienzymkomplexes beschrieben. Im einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

1. Es wurden erstmals Acetyltransferase-defekte fas-Mutanten identifiziert. Solche Mutanten bilden eine eigene Komplementationsgruppe (Va). Sie weisen in den meisten Fällen zusätzliche Aktivitätsverminderungen in mindestens einer der beiden anderen Acyl-Transferasen des Fettsäuresynthetase-Komplexes auf.
2. Bei der Suche nach Pantethein-freien fas-Mutanten konnte außer der bereits bekannten Komplementationsgruppe VII lediglich eine Einzelmutante dieses Typs (fas2-2562 in Komplementationsgruppe X) jedoch keine eigene neue Gruppe identifiziert werden.
3. Es wurde eine neuartige fas-Komplementationsgruppe (X) charakterisiert, deren Mutanten einen Fettsäuresynthetase-Komplex enthalten, welcher keine Gesamt-Fettsäuresynthetaseaktivität besitzt, obwohl alle Teilaktivitäten im Modellversuch deutlich meßbar vorhanden sind. Es wird geschlossen, daß hier eine Acylverschiebung innerhalb des Komplexes unterbunden ist.
4. Es wurde eine außergewöhnliche Enoylreduktase-Mutante charakterisiert, welche von den 5 normalerweise nicht-kovalent im Komplex gebundenen FMN-Molekülen nur noch eines in vergleichbarer Bindung enthält, während die restlichen FMN-Moleküle in diesem Mutantenzym offenbar kovalent an das Enzymprotein fixiert sind. Gleichzeitig mit dieser andersartigen Bindung verändern sich die spektralen Eigenschaften des Enzyms drastisch.
5. Eine systematische biochemische Analyse einer größeren Zahl repräsentativer mutierter Fettsäuresynthetase-Komplexe ergab Aufschluß über gewisse grundsätzliche Wechselwirkungen zwischen ein-

zelnen Teilaktivitäten des Komplexes. Neben den schon bekannten Wechselbeziehungen zwischen den 3 Acyl-Transferasen (in  $\beta$ ) wurden solche zwischen  $\beta$ -Ketoacyl-Synthase und Enoyl-Reduktase (in  $\alpha$  bzw.  $\beta$ ) sowie zwischen  $\beta$ -Ketoacyl-Reduktase und Dehydratase (ebenfalls in  $\alpha$  und  $\beta$ ) gefunden. Es sind also innerhalb des Fettsäuresynthetase-Komplexes nicht nur intramolekulare sondern auch intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen experimentell feststellbar.

6. Experimente zum Mechanismus der Fettsäuresynthetase-Reaktion haben gezeigt, daß das Lynen'sche Modell des Reaktivierungs-Mechanismus revidiert werden muß, indem nicht erst die gesättigte Fettsäure, sondern offenbar schon die  $\beta$ -Hydroxy- oder die  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigte Fettsäure von der Jodacetymid-geschützten zentralen auf eine andere Jodacetamid-empfindliche SH-Gruppe übertragen wird. Dies ging aus Versuchen mit isolierten  $\beta$ -Untereinheiten hervor, welche eine durch Jodacetamid hemmbare Enoylreduktase-Aktivität besaßen.
7. Gereinigte Fettsäuresynthetase aus Wildtyp-Hefe wurde dissoziiert und unter schonenden Bedingungen wieder reassoziert. Dabei konnte die ursprüngliche Enzymaktivität nahezu vollständig wieder zurückgehalten werden. Bei Verwendung älterer Enzympräparationen gelang auf diese Weise die Abtrennung denaturierter Komponenten und damit eine "Reaktivierung" des Enzyms.
8. Durch reversible Dissoziation des Fettsäuresynthetase-Komplexes gelang die vollständige Abtrennung des Cofaktors FMN. Das so erhaltene Apoenzym konnte durch Zusatz von FMN zu 50 %, durch das in vivo nicht benutzte FAD zu 25 % reaktiviert werden.
9. Durch Dissoziation und gemeinsame Reassoziaton der Untereinheit aus jeweils 2 geeigneten mutierten Fettsäuresynthetasen konnten erfolgreich in vitro Komplementationsversuche durchgeführt werden. Die erzielten spezifischen Aktivitäten der hybriden Enzymkomplexe waren vergleichbar denen der in entsprechenden diploiden Zellen in vivo synthetisierten Enzyme.

10. Durch in vitro Kombination von Untereinheiten geeigneter Pantethein-freier Fettsäuresynthetase-Komplexe konnte ein Apoenzym hergestellt werden, das in Gegenwart von Coenzym A und einem rohen Hefezellextrakt zu Holoenzym aktiviert wurde. Auf diesem Wege gelang erstmals der experimentelle Nachweis des Enzyms Coenzym A: Apo-Fettsäuresynthetase O-Phosphopantethein-Transferase in Hefe.
11. Es wurden einige präparative Verbesserungen der Fettsäuresynthetase-Isolierung aus Hefe entwickelt, die es erlauben, in kürzerer Zeit und mit wesentlich besserer Ausbeute das Enzym zu reinigen.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. LYNEN, F., OESTERHELT, D., SCHWEIZER, E. und WILLICKE, K. (1968) in Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism, ed. Gran, F.C., (Universitets for laget, Oslo) pp. 1-24.
2. BLOCH, K. und VANCE, D.: Control Mechanism in the Synthesis of Saturated Fatty Acids. Ann. Rev. Biochem. 46: 263-298 (1977).
3. VOLPE, J.J. & VAGELOS, P.R.: Saturated Fatty Acid Biosynthesis and its Regulation. Ann. Rev. Biochem. 42, 21-60 (1973).
4. WAKIL, S.J. (1970) in Lipid Metabolism, (Academic Press, New York) p. 1-48.
5. SCHWEIZER, E.: Regulation der Fettsäurebiosynthese in Hefe. fette-seifen-anstrichmittel 82, 49-56 (1980).
6. VAN DEN BOSCH, H., WILLIAMSON, J.R. und VAGELOS, P.R.: Localization of Acyl Carrier Protein in E. coli. Nature 228, 338-341 (1970).
7. RUTKOSKI, A., JAWORSKY, J.G.: Fatty Acid Synthetase from Chloroplasts of Soybean Cotyledons: ACP Activation and CoA Inhibition. Biochem. Biophys. Comm. 84, 428-434 (1978).

8. GOLDBERG, I. und BLOCH, K.: Fatty Acid Synthetase in *Euglena gracilis*.  
J. Biol. Chem. 247, 7349-7357 (1972).
9. STOOPS, J.K., ROSS, P., ARSLANIAN, M.J., AUNE K.C. & WAKIL, S.J.: Physiochemical Studies of the Rat Liver and Adipose Fatty Acid Synthetase.  
J. Biol. Chem. 254, 7418-7426 (1979).
10. SCHWEIZER, E. & LYNEN, F. (1978) Multienzyme Complexes, Molecular Organization and Functional Interaction of Active Sites Within the Fatty Acid Synthetase Multienzyme Complex of Yeast. in Transport by Proteins. Editors Blauer G., Sund H. (Walter de Gruyter u. Co Berlin, New York) p. 103-121.
11. VANCE, D.E., MITSUHASHI, O., BLOCH, K.: Purification and Properties of the Fatty Acid Synthetase from *Mycobacterium phlei*.  
J. Biol. Chem. 248, 2303-9 (1973).
12. LYNEN, F. (1972) Enzyme systems for Fatty Acid Synthesis. in Current Trends in the Biochemistry of Lipids (J. Ganguly and R.M.S. Smellie, eds.) Academic Press, New York p. 5-26.
13. STOOPS, J.K., ARSLANIAN, M.J., YANG, H. OH., AUNE, K.C., VANAMAN, T.C. & WAKIL, S.J.: Presence of Two Polypeptide Chains Comprising Fatty Acid Synthetase.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1940-1944 (1975).
14. HARDIE, D.G. & COHEN, P.: Purification and Physiochemical Properties of Fatty Acid Synthetase

- and Acetyl-CoA Carboxylase from Lactating Rabbit Mammary Gland. *Eur. J. Biochem.* 92, 25-34 (1978).
15. STOOPS, J.K. & WAKIL, S.J.: The Isolation of the two Subunits of Yeast Fatty Acid Synthetase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 84, 225-231 (1978).
  16. ELVOSON, I.: Purification and Properties of the Fatty Acid Synthetase Complex from *Neurospora crassa* and the Nature of the fas-Mutation. *J. Bacteriol.* 124, 524-33 (1975).
  17. WOOD, W.I., PETERSON, D.O. & BLOCH, K.: Subunit Structure of *Mycobacterium smegmatis* Fatty Acid Synthetase. *J. Biol. Chem.* 253, 2650-2656 (1978).
  18. KNOCKE, H.W., KOTHOS, K.E.: Characterization of a Fatty Acid Synthetase from *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Biol. Chem.* 248, 3517-19 (1973).
  19. KRESZE, G.B., STEBER, L., OSTERHELT, D. and LYNEN, F.: Reaction of Yeast Fatty Acid Synthetase with Jodacetamide. *Eur. J. Biochem.* 79, 181-190 (1977).
  20. SCHWEIZER, E., HOLZNER, U., MEYER, K.-H., TAURO, P. & SCHWEIZER, M. (1974). The Genetics of Fatty Acid Biosynthesis in Yeast. in: *Comparative Biochemistry and Physiology of Transport*, eds. L. Bolis, K. Bloch, S.E. Luria and F. Lynen. (North-Holland Publishing Company-Amsterdam, (The Netherlands)).

21. STOOPS, J.K., AWAD, E.S., ARSLANIAN, M.J.,  
GUNSBERG, S., WAKIL, S.J., & OLIVER, R.M.:  
Subunit composition and Structural Organization of a Large Multifunctional Enzyme  
Complex. *J. Biol. Chem.* 25, 4464-4475 (1978).
22. SCHWEIZER, E., DIETLEIN, G., KNOBLING, A.  
TAHEDL, H.W., SCHWIETZ, H. & SCHWEIZER, M.  
(1975) Yeast Fatty Acid Synthetase Comprising Two Multifunctional Polypeptide Chains.  
*Proc. Tenth FEBS Meeting Paris*, p. 85-97.
23. SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H. & HOLZNER, U.: Pantetheine-Free Mutants of the  
Yeast Fatty-Acid-Synthetase Complex.  
*Eur. J. Biochem.* 39, 353-362 (1973).
24. SCHWEIZER, E., WILLECKE, K., WINNEWISSE, W.  
& LYNEN, F.: The Role of Phosphopantetheine  
in the Yeast Fatty Acid Synthetase Complex.  
*Vitamins and Hormones* 28, 329-343 (1970).
25. SCHWEIZER, E., WERKMEISTER, K. & JAIN, M.K.:  
Fatty Acid Biosynthesis in Yeast. *Molecular  
Cell. Biochem.* 21, 95-107 (1978).
26. ELOVSON, J. & VAGELOS, P.R.: Acyl Carrier Protein X. Acyl Carrier Protein Synthetase.  
*J. Biol. Chem.* 243, 3603-3611 (1968).
27. WIELAND, F., RENNER, L., VERFÜRTH, C. & LYNEN, F.: Studies on the Multi-Enzyme Complex of  
Yeast Fatty-Acid Synthetase. Reversible Dissociation and Isolation of Two Polypeptide  
Chains. *Eur. J. Biochem.* 94, 189-197 (1979).

28. BISSWANGER, H. & SCHMINCKE-OTT (1980) Multi-functional Proteins.  
(E. John Wiley and Sons, New York)
29. RANDERATH, K. (1962) Dünnschichtchromatographie.  
(Verlag Chemie, Weinheim, Bergstr.)
30. SCHWEIZER, E. (1963) Darstellung von radioaktivem Coenzym A sowie Untersuchungen zum Mechanismus der Fettsäuresynthetase.  
Dissertation, Universität München.
31. DECKER, K. (1955) Dissertation, Universität München.
32. DECKER, K. (1959) Die aktivierte Essigsäure.  
(Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart)
33. EGGERER, H. & LYNEN, F.: Zur Biosynthese der Fettsäure, II: Synthese und Eigenschaften von S-Malonyl-Coenzym A.  
Biochem. Z. 335, 540 (1962).
34. MAJERUS, P.W., ALBERTS, A.W. & VAGELOS, P.R.  
(1969) in Meth. Enzym. XIV, 43-56.
35. OCHOA, S. (1955) in Meth. Enzym. I, p. 688
36. KUHN, R. & QUADBECK, G.: Darstellung und Wirkungen von Acetyl-Derivaten des Cysteamins.  
Chem. Ber. 84, 844 (1951).
37. SCHWEIZER, E., LERCH, I., KROEPLIN-RUEFF, L. & LYNEN, F.: Fatty Acyl Transferase. Characterization of the Enzyme as Part of the Yeast

- Fatty Acid Synthetase Complex by the Use of Radioactively Labeled Coenzyme A.  
Eur. J. Biochem. 15, 472-482 (1970).
38. SEUBERT, W.: S-Palmityl-CoA.  
Biochem. Prep. 7, 80 (1960).
39. LYNEN, F.: Biosynthesis of saturated fatty acids.  
Fed. Proc. 20, 941 (1961).
40. KUNITZ, M.: Crystalline inorganic pyrophosphate isolated from bakers yeast.  
I. Gen. Physiol. 35, 423 (1952)
41. KÜHN, L., CASTORPH, H. & SCHWEIZER, E.: Gene-Linkage and gene-Enzyme relationship in the fatty acid and synthetase system of *Saccharomyces cerevisiae*.  
Eur. J. Biochem. 24, 492 (1972).
42. LING, R.S. & HOSENEY, R.C.: Effect of certain Nutrients on the Gas produced in Preferments.  
Cereal Chem. 54(3), 597-604 (1977).
43. MÜCKE, D. (1957) Einführung in mikrobiologische Bestimmungsverfahren. (VEB, Georg Thieme Verlag, Leipzig).
44. KÜHN, K.L. (1972) Genetische und Biochemische Charakterisierung von Fettsäuresynthetase-Mutanten in *Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation Würzburg.
45. LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E.M.: Replica plating and indirect selection of bacterial mutants.  
J. Bacteriol. 63, 399-406 (1952).

46. BEISENHERZ, B., BOLTZE, H.J., BÜCHER, Th.,  
CZOH, R., CARBACHE, K.H., MEYER-ARENDT, E.  
& PFLEIDERER, G.: Die Phosphofruktose-  
Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase,  
Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-  
Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kanin-  
chenmuskel in einem Arbeitsgang.  
Z. Naturf. 8b, 555-577 (1953).
47. ITZHAKI, R.F. & GILL, D.M.: A Micro-Biuret  
Method for Estimating Proteins.  
Anal. Biochem. 9, 401-410 (1964).
48. WARBURG, O. & CHRISTIAN, W.: Wasserstoffübertra-  
gende Fermente.  
Biochem. Z. 310, 384 (1941).
49. HESS, S. (1976) Untersuchungen mit spezifischem  
Anti-Fettsäuresynthetase Serum. Partielle Pro-  
tolyse des Multienzymkomplexes.  
Dissertation Universität München.
50. CAMPBELL DAN H. (1974) in "Methods in Immunology"  
Second Edition (W.A. Benjamin, Inc. Reading,  
Massachusetts) p. 246.
51. OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion in Gel.  
Progr. Allergy, 6, 30 (1962).
52. LC-PARTIGEN. Behringwerke AG, Med. Information  
und Vertrieb.
53. LYNEN, F. (1962) Fatty Acid Synthesis from Malonyl-  
CoA. in Meth. Enzym. V. 443-451.

54. Mitteilung Nr. 251 Behringwerke AG D./E./F./  
lt. Anq. 1974/RA 1191 O.
55. SCHRECKENBACH, T. (1978) Zur Primärstruktur des  
Acyl Carrier Proteins von Fettsäuresynthetase  
aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
56. SEKAR, V. & HAGEMANN, J.H.: Specificity of the  
Serine Protease Inhibitor, Phenylmethylsul-  
fonyl Fluoride.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 89, 474-478  
(1979).
57. DRAWERT, E. & BEDNAR, J.: Über die elektrophore-  
tische Differenzierung und Klassifizierung  
von Proteinen IV. Vergleichende Untersuchungen  
über den Aufschluß von Hefezellen.  
Chem. Mikrobiolol. Technol. Lebensm. 3, 69-75  
(1974).
58. TZAGOLOFF, A.: Assembly of the Mitochondrial Mem-  
brane System. I. Charaterization of some Enzymes  
of the Inner Membrane of Yeast Mitochondria.  
J. Biol. Chem. 244, 5020-5026 (1969).
59. ARIES, V. & KIRSOP, B.H.: Sterol Biosynthesis by  
Strains of Saccharomyces Cerevisiae in the  
Presence and Absence of Dissolved Oxygen.  
J. Inst. Brew. 84, 118-122 (1978).
60. persönliche Mitteilung der Firma Chemap (1978).
61. LYNEN, F. (1969) Yeast fatty acid synthetase. in  
Meth. Enzym. XIV, 17.

62. BERGMAYER, H.K. (1977) Grundlagen der enzymatischen Analyse. (Verlag Chemie, Weinheim, New York) S. 145.
63. ZIEGENHORN, J. (1970) Charakterisierung der Acetyl-Transferase in der Fettsäure-Synthetase aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
64. SUMPER, M. (1970) Der Multienzymkomplex Fettsäuresynthetase aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
65. KRESZE, G.-B. (1976) Zur Reaktion von Fettsäuresynthetase aus Hefe mit Jodacetamid.  
Dissertation, Universität München.
66. WEITHMANN, K.K. (1974) Zur Kenntnis der Teilaktivitäten und der Untereinheiten des Multienzymkomplexes Fettsäuresynthetase aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
67. WIELAND, F. (1978) Zur Struktur der Fettsäuresynthetase aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
68. KNOBLING, A. (1975) Nachweis und Biochemische Charakterisierung von Malonyl- und Palmityl-Transferase-Defekten Mutanten des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe.  
Diplomarbeit, Universität Würzburg.
69. GORDON, T.J.: Inaktivierung of the Protease Inhibitor Phenylmethylsulfonylfluoride in Buffers. Anal. Biochem. 23, 574 (1978).

70. SCHWEIZER, E. & BOLLING, H.: A *Saccharomyces cerevisiae* mutant defective in saturated fatty acid biosynthesis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 660 (1970).
  
71. OESTERHELT, D. (1967) Zur Kenntnis der Fettsäuresynthetase aus Hefe.  
Dissertation, Universität München.
  
72. JENDRISAK, J.J. & BURGESS R.R.: A New Method for the Large-Scale Purification of Wheat Germ DNA-Dependent RNA Polymerase II Biochemistry 14, 4639-4645 (1975).
  
73. VAN DER HAAR, F.: Purification of Proteins by Fractional Interfractional, Salting out on Unsubstituted Agarose Gels. Biochem. Biophys. Res. Comm. 70, 1009-1013 (1976)
  
74. SCHWEIZER, E., WILLECKE, K., WINNEWISSER, W. and LYNEN, F.: The role of Phosphopantetheine in the Yeast Fatty Acid Synthetase Complex. Vitamins and Hormones 28, 329-343 (1970).
  
75. OESTERHELD, D., BAUER, H., KRESZE, J.B., STREBER, L., LYNEN, F.: Reaction of Yeast Acid Synthetase with Iodoacetamide.  
Eur. J. Biochem. 79, 173-180 (1977).
  
76. VISSER, J. & VEEGER, C.: Relation between Conformations and Activities of Lipoamide Dehydrogenase.  
Biochem. Biophys. Act. 206, 224-241 (1970).

77. STEWART, G.G. & GORING, R.E.: Effect of some Monovalent and Divalent Metal Ions on the Flocculation of Brewers Yeast Strains.  
J. Inst. Brew. 82, 341-342 (1976).
78. SEUBERT, W. (1962) in Methoden der enzymatischen Analyse, (H.U. Bergmeyer (Hrsgb.) Verlag Chemie, Weinheim) S. 433.
79. GOOD, N.E., WINGET, G.D., WINTER, W., CONNOLLY, T.N., IZAWA, S. & SINGH M.M.: Hydrogen Ion Buffers for Biological Research.  
Biochemistry 5, 467-477 (1966).
80. YALPANI, M., WILLECKE, K. & LYNEN, F.: Triacetic Acid Lactone, a Derailment Product of Fatty Acid Biosynthesis.  
Eur. J. Biochem. 8, 495-502 (1969).
81. SCHWEIZER, E., PICOININI, F., DUBA, C., GÜNTHER, S., RITTER, E. & LYNEN, F.: Die Malonyl-Bindungsstellen des Fettsäuresynthetase-Komplexes aus Hefe.  
Eur. J. Biochem. 15, 483-499 (1970).
82. H.U. BERGMAYER (1974) in Methoden der enzymatischen Analyse (Verlag Chemie Weinheim, Bergstr.) III. Auflage S. 471.
83. DIETLEIN, G. & SCHWEIZER, E.: Control of Fatty Acid-Synthetase Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.  
Eur. J. Biochem. 58, 177-184 (1975).

84. ENGESER, H., HÜBNER, K., STRAUB, J. & LYNEN, F.  
(1979) Identity of Malonyl and Palmitoyl  
Transferase of Fatty Acid Synthetase from  
Yeast. 2. A Comparison of Active-Site Pep-  
tides.  
Eur. J. Biochem. 101, 413-422 (1979).
85. HALES, C.N. & RANDLE P.J.: Immunoassay of In-  
sulin with Insulin-Antibody Precipitate.  
Biochem. J. 88, 137-145 (1963).
86. SCHWEIZER, E., KNIEP, B., CASTORPH, H., HOLZNER,  
U.: Pantetheine-Free Mutants of the Yeast  
Fatty-Acid-Synthetase Complex.  
Eur. J. Biochem. 39, 353-362 (1973).
87. ENGESER, H., HÜBNER, K., STRAUB, J. & LYNEN, F.:  
Identity of Malonyl and Palmitoyl Transferase  
of Fatty Acid Synthetase from Yeast. I. Func-  
tional Interrelationships between the Acyl  
Transferases.  
Eur. J. Biochem. 101, 407-412 (1979).
88. HIRS, C.H.W. (1967) Performic Acid Oxidation.  
in: Meth. Enzym. XI, 197-199.
89. ZIEGENHORN, J., NIEDERMEIER, R., NÜSSLER, C. &  
LYNEN, F.: Charakterisierung der Acetaltrans-  
ferase in der Fettsäuresynthetase aus Hefe.  
Eur. J. Biochem. 30, 285-300 (1978).
90. OESTERHELT, D., BAUER, H. & LYNEN, F.: Crystalli-  
zation of a Multienzyme Complex. Fatty Acid  
Synthetase from Yeast. Proc. Natl. Acad. Sci.  
USA 63, 1377-1382 (1969).

91. CERLETTI, P., FIORDANO, M.F. (1971) Determination of Flavin Compounds in Tissue. in Meth. Enzym. XVIII, Part D, S. 285.
92. HEMMERICH, P., VEEGER, C. & WOOD, H.C.S.: Fortschritte in Chemie und Molekularbiologie der Flavine und Flavocoenzyme. Angew. Chem. 16, 699-716 (1965).
93. THEORELL, H. & NYGAARD, A.P.: The Effect of pH, Anions and Temperature on the Dissociation and Reassociation of the Old Yellow Enzyme. Acta Chem. Scand. 8, 1646-1658 (1954).
94. YODIM M.B.H. & SALACH, J.T. (1976) The Active Site of Monoamine Oxidase, Binding Studies with <sup>14</sup>-Acetylenic and Non-Acetylenic Inhibitors. in Flavins and Flavoproteins, ed. T.P. Singer (Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam) p. 135.
95. MOORE, E.J., GHISLA, W., MASSEY, V.: Properties of Flavies where the 8-Methyl Group Is Replaced by Mercapto-Residues. J. Biol. Chem. 254, 8173-8178 (1979).
96. PRESSWOOD, R., HASTINGS, J.W.: Oxygen Dependent and Independent Stops in Luciferase-FMNH<sub>2</sub> Oxidation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 82, 990-996 (1978).
97. POWELL, G.L., ELOVSON, J. & VAGELOS, P.R.: Acyl Carrier Protein XII. Synthesis and Turnover of the Prosthetic Group of Acyl Carrier Protein in Vivo. J. Biol. Chem. 244, 5616-5624 (1969).

98. KNIEP, B. (1973) Isolierung von Pantetheinfreien Mutanten des Fettsäuresynthetase Komplexes der Hefe.  
Diplomarbeit, Universität Würzburg.
99. WELLS, W.W., SCHULTZ, J. & LYNEN, F.: Studies on the Incorporation of I-<sup>14</sup>C-Pantothenate into the Fatty Acid Synthetase Complex of Baker's Yeast.  
Biochem. Z. 346, 474-490 (1967).
100. ECKERT, H.G.: Die Technik des Radioimmunoassays  
Angew. Chem. 88, 565-574 (1976).
101. SCHWEIZER, E.: Biosynthese und Struktur des Fettsäuresynthetase-Komplexes der Hefe.  
Naturwissenschaften 64, 366-370 (1977).
102. BEYREUTHER, K., BÖHMER, H. & DIMROTH, P.: Amino-Acid Sequence of Citrate-Lyase Acyl-Carrier-Protein from Klebsiella aerogenes.  
Eur. J. Biochem. 87, 101-110 (1978).
103. STROM, K.A., GALEOS, W.L., DAVIDSON, L.A. & KUMAR, S.: Enoyl Coenzyme A Reduction by Bovine Mammary Fatty Acid Synthetase. Specificity and Other Characteristics.  
J. Biol. Chem. 254, 8153-8158 (1979).
104. MOSS, B., ROSENBLUM, E.: Hydroxylapatite Chromatography of Protein-Sodium Dodecyl Sulfat Complexes.  
J. Biol. Chem. 247, 5194-5198 (1972).

105. KRESZE, G.B., OESTERHELT, D. & LYNEN, F.,  
CASTORPH, H. & SCHWEIZER, E.: Localization  
of the Central and Paripheral SH-Groups on  
the Same Polypeptide Chain of Yeast Fatty  
Acid Synthetase.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 69, 893-899  
(1976).
106. ENGESER, H., WIELAND, F. & LYNEN, F.: Locali-  
zation of Three Non-Thiol Binding Sites on  
Polypeptide Chain B of Yeast Fatty Acid  
Synthetase.  
FEBS Letters 82, 139-142 (1977).
107. STROM, K.A. & KUMAR, S.: Activation and Inhi-  
bition of Crotonyl-Coenzyme A Reductase  
Activity of Bovine Mammary Fatty Acid Syn-  
thetase.  
J. Biol. Chem. 254, 8159-8162 (1979).
108. WIELAND, F., SIESS, F.A., RENNER, L., VERFÜRTH,  
C., LYNEN, F.: Distribution of yeast fatty  
acid synthetase subunits: Three dimensional  
model of the enzyme.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5792-5796  
(1978).
109. MERKENSCHLAGER, M., SCHLOSSMANN, K. und KURZ.:  
Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine  
Anwendbarkeit auf biologische Probleme.  
Biochem. Zeitschr. 329, 332-340 (1953).
110. FINCHAM, J.R.S. (1968) Genetic Complementation,  
ed. Benjamin, W.A. (New York, Amsterdam).

111. FRENKEL, E.P. & KITCHENS, R.L.: Purification and Properties of Acetyl Coenzyme A Synthetase from Baker's Yeast.  
J.Biol. Chem. 252, 504-507 (1977).
112. TZAGOLOFF, A.: Assembly of the Mitochondrial Membrane System. II. Synthesis of the Mitochondrial Adenosine Triphosphatase F<sub>I</sub>.  
J. Biol. Chem. 244, 5027-5033 (1969).
113. BURGESS, R.R. & JENDRISAK, J.J.: A Procedure for the Rapid, Large-Scale Purification of Escherichia coli DNA-Dependent RNA Polymerase Involving Polymin P Precipitation and DNA-Cellulose Chromatography.  
Biochemistry 14, 4634-4638 (1975).
114. Du Pont Instruments Centrifuge Application Bulletin in Ultracentrifugation No. 2.
115. MEYER, K.H. (1975) Untersuchungen zum Fettsäurerestoffwechsel in Hefen.  
Dissertation, Universität Würzburg.
116. ROBERTS, L.M.: Unveröffentlichte Ergebnisse.
117. QURESHI, A.A., KIM, M., LORNITZO, F.A., JENIK, R.A. & PORTER, J.W.: Separation of Pigeon Liver Apo- and Holo-Fatty Acid Synthetase by Affinity Chromatography.  
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 836-844 (1975).
118. FINCHAM, J.R.S.: Allelic Complementation Reconsidered.  
Carlsberg Res. Commun. 42, 421-430 (1977).

119. CRICK, F.H.C., ORGEL, L.E.: The theory of inter-allelic complementation.  
J. Mol. Biol. 8, 161-165 (1964).
120. SCHLESINGER, M.J., LEVINTHAL, C.: Complementation at the molecular level of enzyme interaction.  
Ann. Rev. Microbiol. 19, 267-284 (1965).
121. SCHLESINGER, M.J., LEVINTHAL, C.: Hybrid Protein Formation of E. coli Alkaline Phosphatase. Leading to in vitro Complementation.  
J. Mol. Biol. 7, 1-23 (1963).

## LEBENS LAUF

Ich wurde am 17. Oktober 1944 in Lindow/Neuruppin geboren. Meine Eltern sind der Chemotechniker Werner Werkmeister und seine Frau Gisela, geb. Krüger.

1951 - 1955      Grundschule zunächst in Erlangen, dann  
in Schwenningen a/N.

März      1966      Abitur

1966 - 1968      Zeitsoldat bei der Bundeswehr

April      1968      Beginn des Lebensmittelchemiestudiums  
an der Friedrich-Alexander-Universität  
in Erlangen.

Oktober 1973      lebensmittelchemische Vorprüfung

April      1975      Teil A der Hauptprüfung für Lebensmittel-  
chemiker

Mai      1976      Zweite Staatsprüfung für Lebensmittel-  
chemiker

Nov.      1976-      Anfertigung der Doktorarbeit am Institut  
März      1980      für Mikrobiologie und Biochemie der Uni-  
versität Erlangen unter der Anleitung  
von Prof. Dr. E. Schweizer

Seit      1970      bin ich mit Christiane Neumann verheiratet.  
Wir haben zwei Kinder.



